

Doktori (PhD) értekezés

**Az S-metilmetionin és az S-metilmetionin-szalicilát hatása kukorica csíkos mozaik vírus
fertőzése esetén**

Készítette: *Ludmerszki Edit*

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológia Doktori Iskola

Prof. Dr. Erdei Anna

Kísérletes Növénybiológia Program

Prof. Dr. Szigeti Zoltán

Dr. Kovács M. Gábor

Témavezető:

dr. Rudnóy Szabolcs

egyetemi adjunktus

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék



Budapest, 2017

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	6
Bevezetés	9
1. Irodalmi áttekintés	10
1.1. A kukorica (<i>Zea mays</i> L.)	10
1.2. A kukorica csíkos mozaik vírus (MDMV)	11
1.2.1. A növényi stressz általános jellemzése	11
1.2.2. Az MDMV jellemzése	11
1.2.3. A vírus mennyiségének kimutatása, változása különböző kezelések hatására	13
1.3. A növény védekezése vírusfertőzés ellen	15
1.3.1. A fotoszintetikus rendszer védelme	16
1.3.2. A fenoloidszármazékok és szerepük a növényi védelemben	17
1.3.3. Az antioxidáns rendszer	18
1.3.3.1. A peroxidázok és szerepük a növényi védekezésben	19
1.3.4. MDMV-fertőzés során magasabb expressziót mutató gének	20
1.4. Az S-metilmetionin (SMM) és szerepe a növényi védelemben	21
1.5. A szalicilsav (SA) és védő hatása	22
2. Célkitűzések	25
3. Anyagok és módszerek	26
3.1. A növénynevelés körülményei	26
3.2. SMM- és MMS-kezelés menete	27
3.3. MDMV-fertőzés kivitelezése	27
3.4. Enzimmötött immunszorbens vizsgálat (ELISA) leírása	27
3.5. A klorofilltartalom meghatározása	29
3.6. A nem-fotokémiai kioltás komponenseinek mérése	29
3.7. A fluoreszcencia-leképezés menete	31
3.8. Az összfenoloid-tartalom meghatározása fotometriás módszerrel	31
3.9. Enzimkinetikai vizsgálatok leírása	32
3.9.1. Kinyerő puffer elkészítése, a kinyerés menete	32
3.9.2. Az APX enzimaktivitás mérése	33
3.9.3. A GR enzimaktivitás meghatározása	33
3.9.4. A GPX enzimaktivitásának mérése	34
3.10. RNS-kinyerés és cDNS-átírás	34
3.11. Real-time PCR technikák	35
3.11.1. Relatív qRT-PCR SYBR Green I festékkel	36
3.11.2. Abszolút qRT-PCR hibridizációs próbával	38
3.12. Statisztikai vizsgálatok	39
4. Eredmények	40
4.1. Az MDMV mennyiségi változásai	40

4.1.1. A vírus mennyiségi változása SMM-előkezelés hatására	41
4.1.2. Az MMS-előkezelés hatása a vírus mennyiségi változásaira	41
4.2. A klorofilltartalom változásai	41
4.3. A nem-fotokémiai kioltás paramétereinek változásai a kezelések hatására	44
4.3.1. A nem-fotokémiai kioltás változásai fertőzés hatására	45
4.3.2. Az SMM-kezelés hatásai a nem-fotokémiai kioltásra	46
4.3.3. Az MMS-kezelés hatásai a nem-fotokémiai kioltásra	46
4.3.4. Változások a fertőzött növények nem-fotokémiai kioltásában SMM- és MMS- előkezelések hatására	47
4.3.5. Az MDMV-fertőzés hatásai a Φ -paraméterek változásaira	49
4.3.6. A nem-fotokémiai kioltás Φ -paramétereinek változásai az SMM-kezelés hatására	50
4.3.7. Az MMS-kezelés hatásai a Φ -értékekre	50
4.3.8. Változások a Φ -értékekben SMM- és MMS-előkezelések hatására fertőzött növényeknél	50
4.4. A fenoloidtartalom változásai fertőzött és a vegyületekkel előkezelt növényekben	51
4.4.1. A fluoreszcencia-leképezés során 440 és 520 nm-en mért emisszióváltozás eredményei	51
4.4.1.1. A fertőzés hatásai a 440 és 520 nm-es fluoreszcenciaemissziók változására	51
4.4.1.2. Az SMM-kezelés hatásai a fluoreszcenciahozamok változására	52
4.4.1.3. Az SMM-előkezelés hatása fertőzött növényeknél a 440 és 520 nm-es fluoreszcenciaértékekre	52
4.4.2. A fotometriás méréssel meghatározott összfenoloid-tartalom és változásai	53
4.4.2.1. A fertőzés hatása az összfenoloid-tartalom változásaira	53
4.4.2.2. Az SMM-kezelés hatásai az összfenoloid-tartalomra	53
4.4.2.3. Az MMS-kezelés hatásai az összfenoloid-tartalomra	53
4.4.2.4. Az SMM- és MMS-előkezelések hatásai az összfenoloid-tartalomra fertőzött növényeknél	53
4.4.3. A fenilpropanoid bioszintézis útvonal vizsgálata	55
4.4.3.1. MDMV-fertőzés hatása a <i>C4H</i> gén expressziójára	55
4.4.3.2. Az SMM-kezelés hatása a <i>C4H</i> gén expressziójára	55
4.4.3.3. Az MMS-kezelés hatása a <i>C4H</i> gén expressziójára	55
4.4.3.4. Az SMM- és MMS-előkezelések hatása a <i>C4H</i> gén expressziójára vírusfertőzött növényekben	55
4.4.3.5. A fertőzés hatása a <i>CHS</i> gén expressziójára	56
4.4.3.6. Az SMM- és MMS-kezelés hatása a <i>CHS</i> gén expressziójára	56
4.4.3.7. Az előkezelések hatása a <i>CHS</i> gén expressziójára fertőzött növényekben mérve ..	56
4.5. Az antioxidáns enzimek aktivitásbeli és génexpressziós változásai	59
4.5.1. Az aszkorbát-peroxidáz génexpressziós és enzimkinetikai változásai	59
4.5.1.1. A fertőzés hatása az APX aktivitására	59
4.5.1.2. Az SMM-kezelés hatásai az APX aktivitására	59
4.5.1.3. Az MMS-kezelés hatása az APX enzimaktivitására és génepxressziójára	60
4.5.1.4. Az előkezelések hatása a fertőzött növényekben mérhető APX enzimaktivitására és génjének expressziójára	60

4.5.2. A glutation-reduktáz enzimaktivitásának és génexpressziójának változásai	64
4.5.2.1. A vírusfertőzés hatása a GR aktivitására.....	64
4.5.2.2. Az SMM-kezelés hatása a GR aktivitására	64
4.5.2.3. Az MMS-kezelés hatása a GR enzimaktivitására és génjének expressziójára.....	64
4.5.2.4. Az SMM- és MMS-előkezelések hatása a GR aktivitására fertőzött növényekben	65
4.5.3. A gvajakol-peroxidáz génexpressziós és enzimaktivitásbeli változásai	69
4.5.3.1. A vírusfertőzés hatása a GPX aktivitására	71
4.5.3.2. Az SMM-kezelés hatásai a GPX aktivitására	71
4.5.3.3. Az MMS-kezelés hatása a GPX enzimaktivitására és a génexpressziójára	71
4.5.3.4. Az előkezelések hatása a fertőzött növényekben mérhető GPX aktivitásra	72
4.6. A vírusfertőzésre specifikusan magasabb expressziót mutató gének aktivitásának változásai	73
4.6.1. Az SMM-kezelés és -előkezelés hatásai a <i>SAMS</i> és <i>GF14-6</i> aktivitására	73
4.6.2. Az MMS-kezelés és -előkezelés hatásai a <i>SAMS</i> és <i>GF14-6</i> aktivitására	74
5. Eredmények értékelése	76
5.1. A vírus mennyiségi változásai	76
5.2. A klorofilltartalom és a nem-fotokémiai kioltás változásai.....	76
5.2.1. Az MDMV-fertőzés hatása a klorofilltartalomra.....	76
5.2.2. A nem-fotokémiai kioltás paramétereinek változásai vírusfertőzés hatására	77
5.2.3. Az SMM-kezelés hatása a klorofilltartalom változására	79
5.2.4. Az SMM-kezelés hatása a nem-fotokémiai kioltás paramétereire.....	80
5.2.5. Az MMS-kezelés hatása a klorofilltartalomra és a PS II-re.....	81
5.3. A stresszvédelemben szerepet játszó fenoloidszármazékok mennyiségi változásai	82
5.3.1. A vírusfertőzés hatása a fenoloidszármazékok változására	83
5.3.2. A fenoloidtartalom változása SMM-kezelés hatására.....	84
5.3.3. Az MMS-kezelés hatása az összfenoloid-tartalomra és a fenilpropanoid bioszintézis útvonalra	85
5.4. Az antioxidáns rendszer és változásai	86
5.4.1. Vírusfertőzés hatása az antioxidáns tulajdonságokkal rendelkező enzimek aktivitására és kifejeződésére	86
5.4.1.1. Az APX enzimaktivitásának és génexpressziójának változása MDMV-fertőzés hatására.....	87
5.4.1.2. A GR kifejeződésének és aktivitásának változásai fertőzés hatására.....	87
5.4.1.3. A GPX enzimaktivitásának és génexpressziójának változásai MDMV-fertőzés során	88
5.4.2. Az SMM-kezelés hatása az antioxidáns enzimekre.....	89
5.4.2.1. Az SMM-kezelés hatása az APX génexpressziós és enzimkinetikai változására ..	89
5.4.2.2. A GR génexpressziós és aktivitásbeli változásai SMM-kezelés hatására	90
5.4.2.3. Változások a GPX aktivitásában és kifejeződésében SMM-kezelés hatására	90
5.4.2.4. Az SMM-kezelés hatásainak összefoglalása.....	91
5.4.3. Az MMS-kezelés hatása az antioxidáns enzimekre	91

5.4.3.1. Változások az APX aktivitásában és génkifejeződésében MMS-kezelés hatására	91
5.4.3.2. Az MMS-kezelés hatása a GR kifejeződésére és aktivitására.....	92
5.4.3.3. Az MMS-kezelés hatása a GPX aktivitásbeli és génexpressziós változására	93
5.4.3.4. Az MMS-kezelés hatásainak az összefoglalása	94
5.5. Az MDMV-fertőzés során aktiválódó növényi gének expressziós változásai	95
5.5.1. A <i>GF14-6</i> génexpressziós változásai.....	95
5.5.1.1. A <i>GF14-6</i> génexpressziós változásai vírusfertőzés során	95
5.5.1.2. Az SMM-kezelés hatása a <i>GF14-6</i> expressziójára	96
5.5.1.3. Az MMS-kezelés hatása a <i>GF14-6</i> expressziós változására	96
5.5.2. A <i>SAMS</i> génexpressziós változásai.....	97
5.5.2.1. A vírusfertőzés hatása a <i>SAMS</i> génexpressziójára	97
5.5.2.2. Az SMM-kezelés hatása a <i>SAMS</i> génexpressziójára.....	97
5.5.2.3. Az MMS-kezelés hatása a <i>SAMS</i> génexpressziós változására	98
5.6. MDMV-fertőzés, továbbá az SMM- és MMS-kezelés hatásainak összefoglalása.....	98
Összefoglalás	102
Summary	103
Irodalomjegyzék	104
Köszönetnyilvánítás	118
DOI adatlap a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához	119

Rövidítésjegyzék

APX	aszorbát-peroxidáz
C4H	fahéjsav-4-hidroxiláz
CaMV	karfiol mozaik vírus
CHS	kalkon-szintáz
DMRT	Duncan-féle többszörös összehasonlító teszt
DTNB	5,5'-ditiobisz-2-nitrobenzosav
DTPA	dietilén-triamin-pentaecetsav
ELISA	enzimkött immunsorbens vizsgálat
FL-FIS	compact flash-lamp fluorescence imaging system
F _m	maximális fluoreszcencia
F _m '	fényadaptált állapotban mért maximális fluoreszcencia
F _v	változó fluoreszcencia
F ₀	minimális, vagy kezdeti fluoreszcencia
GF14-6	G-boks faktor 14-3-3 homológ fehérje
GPX	gvajakol-peroxidáz
GR	glutation-reduktáz
GSH	redukált glutation
GSSG	oxidált glutation-diszulfid
GST	glutation-S-transzferáz
HC-Pro	segítő proteináz
Hcy	homocisztein
HMT	S-metilmationin: homocisztein S-metiltranszferáz
LHC II	PS II-höz kapcsolódó fénygyűjtő antennakomplex
MAPK	mitogén-aktivált protein-kináz
MDMV	kukorica csíkos mozaik vírus
<i>mdmv</i>	MDMV-fertőzött növények csoportja

MEP	membrán fehérje PB1A10.07c
MMS	S-metilmetionin-szalicilát
<i>mms</i>	MMS-kezelt növények csoportja
<i>mms+mdmv</i>	MMS-előkezelt fertőzött növények csoportja
MMT	S-adenozilmetionin: metionin S-metiltranszferáz
NPQ	nem-fotokémiai kioltás
PS I	egyes fotokémiai rendszer
PS II	kettes fotokémiai rendszer
PsbS	PS II S alegysége
qE	Δ pH-függő kioltás
qI	fotoszintézis inhibíciója
qRT-PCR	kvantitatív real-time PCR
qT	state-tranzíció függő kioltás
R	rezisztencia
RISC	RNS-aktivált csendesítő rendszer
rgs-CaM	kalmodulin-szerű fehérje
ROS	reaktív oxigénforma
SA	szalicilsav
SAM	S-adenozilmetionin
SAMS	S-adenozilmetionin-szintáz
SAR	szisztémikus szerzett rezisztencia
SCMV	cukornád mozaik vírus
SMM	S-metilmetionin
<i>smm</i>	SMM-kezelt növények csoportja
<i>smm+mdmv</i>	SMM-előkezelt fertőzött növények csoportja
SNP	nátrium-nitroprusszid
SOD	szuperoxid-diszmutáz
SrMV	cirok mozaik vírus

TMV	dohány mozaik vírus
VDE	violaxantin-dezepoxidáz
VPg	vírus genomjához kötődő fehérje
vsRNS	virális RNS
$\Phi_{f,D}$	fluoreszcencia alapú- és konstitutív hődisszipáció
Φ_{NF}	inaktiválódott PS II reakciócentrumok hődisszipációja
Φ_{NPQ}	ΔpH - és xantofill ciklus-alapú kioltás
$\Phi_{PS II}$	aktív PS II reakciócentrumok hatékonysága

Bevezetés

A kukorica a világon az egyik legnagyobb mennyiségben termesztett mezőgazdasági növényeink egyike. Élelmezési szempontból és takarmánynövényként is jelentős, aminek köszönhetően világszerte nagy hangsúlyt fektetnek kutatására. A kórokozói közül egy virális patogén, a *kukorica csíkos mozaik vírus* (MDMV) emelhető ki. A vírusfertőzés során mozaikos mintázat alakul ki a leveleken, törpenövésűek lesznek az egyedek és jelentős termésveszteség is jelentkezhet, így a patogén nagy gazdasági károkat okozhat. Számos módon lehet védekezni a vírus ellen: permetezőszerek használatával lehet pusztítani a rovarvektort, a fertőzött egyedek eltávolításával csökkenthető a fertőzés intenzitása, illetve hagyományos nemesítési vagy transzgénikus eljárásokkal a fertőzésnek jobban ellenálló fajtákat lehet előállítani. A gyakorlatban azonban egyik módszer sem jelent biztos védelmet a fertőzéssel szemben. Felmerül ezáltal az igény egy olyan természetes alapú védekezés bevezetésére, mellyel a környezetet és a humán és állati egészséget kímélő módon lehetne visszaszorítani a vírus károkozását.

Munkám során arra a kérdésre kerestem a választ, hogy két vegyület, az S-metilmetionin (SMM) és az S-metilmetionin-szalicilát (MMS) milyen hatást fejt ki a növény védekezőrendszerére? Az SMM a növényekben általánosan előforduló, biológiailag aktív, nem proteinogén aminosav, ráadásul U-vitaminként a humán és állatgyógyászatban is széles körben használt. Az MMS egy újonnan szintetizált vegyület, mely SMM mellett szalicilsavat (SA) is tartalmaz, ami szintén általánosan előfordul az élővilágban, és szerves részét képezi számos gyulladáscsökkentő gyógyszerkészítménynek.

Ismert az SMM jótékony hatása pl. az alacsony hőmérséklet okozta növényi stresszel szemben, a szalicilsav pedig bizonyítottan fontos eleme a növényi védekezésnek. Munkám során így annak a lehetőségét vizsgáltam, hogy az SMM és az MMS exogén adagolásával javítható-e a növény védekezése MDMV fertőzéssel szemben, anélkül, hogy károsodna a növény a kezelések hatására. A kérdés megválaszolásához vizsgáltam a klorofilltartalom változásait és a fotokémiai rendszer állapotát. Vizsgáltam a növényi védelemben szerepet játszó anyagok szintézisében jelentős fenilpropanoid bioszintézis útvonalat, illetve a fenoloidok mennyiségi változásait is. A növényi védelem feltérképezéséhez monitoroztam az antioxidáns rendszer változásait, illetve vizsgáltam a vírusfertőzésre specifikusan magasabb expressziót mutató gének kifejeződését is. Végül, de nem utolsósorban feltérképeztem a vírus eloszlását a különböző növényi részek között és vizsgáltam, hogy változik-e a vírus mennyisége a kezelések hatására.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. A kukorica (*Zea mays* L.)

A kukorica, a búza és a rizs után, a harmadik legfontosabb gabonaféle a Földön. Hozzávetőlegesen 10 ezer évvel ezelőtt a mai Közép-Mexikó területén termesztették először, majd innen került Észak- és Dél-Amerikába. Az európai felfedezők csak évszázadokkal később ismerhették meg, onnantól kezdve pedig kétszáz éven belül az egész világon fontos kultúrnövénné vált. A kukorica sok néven ismert: édesbúza, indiánbúza, törökbúza, csutkabúza, tengeri. Magas tápértékű élelemként a többi mezőgazdasági növény mellett fontos szerepet játszott a társadalmak robbanásszerű növekedésében. Carl von Linné kezdetben a *Turcicum frumentum* latin nevet adta a növénynek, mely magyarra fordítva törökbúzát jelent, és csak később módosította a ma is ismert *Zea mays*-ra (Laws 2010).

A növény rendszertani szempontból a Poales rendbe tartozik, azon belül is a Poaceae családba. Egy sziklevéllel csírázik, szórt edénynyalábokkal rendelkezik, mellékgyökérzetet fejleszt és hármasszámú virágkört és két lepelkört alakít ki. Egylaki, váltivarú és egynyári növény. Magassága elérheti a három métert is és szemtermését torzsavirágzatban hozza létre.

A növény a magyar irodalom nagy alakjainak is ihletet adott: Arany János *Tengerihántás*, Petőfi Sándor *János vitéz* (*Kukorica Jancsi*) és Hollósy Simon *Tengerihántás* című művében is felbukkan. A régi magyar kultúrában neves eseménynek tekintették a kukoricafosztást vagy tengerihántást. A falusi házaknál a betakarítást követően összegyűjtötték a kukoricacsöveket, melyeket ismerősök, rokonok és szomszédok együtt tisztítottak meg a csuhétól. A közös munka összehozta az embereket, ezáltal közkedvelt társasági eseménynek számított.

A kukorica mai világunkban sem veszített fontosságából. Főzve és sütve egyformán kiváló csemege. Az érett kukoricaszemeket tovább is száríthatják, melynek eredményeképpen kukoricadarát, kukoricapelyhet, vagy egyéb reggeli-alapanyagot készítenek belőle (Laws 2010). A növény élelem mellett bioüzemanyagként is jelentős szerepet tölthet be, mivel bioetanol nyerhető ki belőle, mely megújuló üzemanyagként felválthatja a fosszilis tüzelőanyagokat.

1.2. A kukorica csíkos mozaik vírus (MDMV)

1.2.1. A növényi stressz általános jellemzése

A növényeket életük során gyakran érik káros környezeti hatások, melyeket összefoglaló néven stressznek nevezünk. Meghatározását tekintve a stressz olyan tényező, ami a növény növekedését és fejlődését, ezáltal szaporodását is a genomban megszabott értékek alatt tartja. A stresszt a környezet egy eleme váltja ki, melyet stresszornak hívunk.

A valóságban a növények életük folyamán nem csak egy stresszorral, hanem számtalannal találkozhatnak. Mivel a biotikus és abiotikus stresszorok általában egyszerre érik a növényeket, így életben maradásukhoz összetett védekezési rendszerrel kell rendelkezniük. Minden stressz más és más molekuláris választ vált ki sejtszinten, azonban ezek a biokémiai útvonalak átfedhetnek egymással. A hatások összeadódnak, de akár ki is olthatják egymást, továbbá különböző növénycsaládokba tartozó egyedek eltérően reagálhatnak azonos stresszorokra. Közös a különböző stresszválaszokban, hogy sokszor növényi hormonok irányítják a védekezési útvonalakat (abszizinsav, etilén, jázmonsavak, stb.). A válaszreakciók sokfélék lehetnek, de az általános válaszok között megemlíthetők a mitogén-aktivált protein-kináz (MAPK) kaszkád aktiválása, illetve hősokkfehérjék, reaktív oxigénformák vagy kis RNS-ek képződése (Atkinson és Urwin 2012).

A biotikus stresszorok közül kiemelt fontossággal rendelkeznek a vírusok. Fennmaradásukhoz teljesen a gazdaszervezetre vannak utalva, és nem különítik el magukat a gazdasejtektől, hanem bennük, velük szinkronban szaporodnak (Lewsey és mtsai 2009). A kukoricát fertőző vírusok közül a kukorica csíkos mozaik vírus (*MDMV - maize dwarf mosaic virus*) emelhető ki (Achon és mtsai 2012).

1.2.2. Az MDMV jellemzése

A fertőzést 1963-ban, Ohióban írták le először. A vírus a természetben levéltetvek útján terjed (Aphidinae, Lachninae és Drepanosiphinae alcsaládok), azonban mechanikai úton is továbbadható egyik egyedről a másikra - utóbbi módszer széles körben elterjedt laboratóriumi körülmények közti fertőzéseknél (Stewart és mtsai 2012).

A „víruskomplex”, melynek tagja az MDMV is (*Potyvirus* nemzetség), jellemzően a Poaceae családba tartozó növényeket fertőzi meg. A komplexbe sorolhatók még a cukornád

mozaik vírus (*SCMV - sugarcane mosaic virus*), és a cirok mozaik vírus is (*SrMV - sorghum mosaic virus*) (Kong és Steinbiss 1998).

A termesztésben levő csemegekukorica vonalak közel 2/3-a fogékony a vírusfertőzésre, továbbá a rezisztensnek vélt egyedek közel 10 %-a megfertőződhet, ha fiatal (2-3 leveles) állapotban találkozik a vírussal (Williams és Pataky 2012). Megfigyelték, hogy a vírus képes szaporodni és terjedni rezisztens növények leveleinek sejtei között, viszont a növényen belüli hosszabb távú terjedés már gátolva van; ebben nyilvánul meg a növény rezisztenciája. A kukorica 6-os kromoszómáján található olyan génszakasz, ami MDMV-fertőzés ellen nyújt rezisztenciát, melyet genetikailag módosít a 3-as és a 10-es kromoszóma (Cassone és mtsai 2014).

Az MDMV leggyakrabban 10-45 % közötti termésveszteséget okoz, de a kár elérheti akár a 100 %-ot is (Oertel és mtsai 1997, Tóbiás és mtsai 2008). A fertőzés során klorotikus foltok jelennek meg a kukorica levelein, valamint törpenövésük lesznek az egyedek (innen származik a *dwarf* elnevezés). Néhány esetben a címer növekedése sérül és a kukoricaszemek megszokott tömött szerkezete is fellazulhat (Gell és mtsai 2010). A természetben maggal és pollennel is tud terjedni a vírus (Li és mtsai 2007). A fertőzés terjedését a rovarvektor mellett egy fűféle, a fenyércirok (*Sorghum halepense*) is segíti, mivel a vírust hordozó levéltetű előszeretettel támadja ezt a növényt, és innen könnyen továbbterjed a mezőgazdasági növényekre. Érdeemes megemlíteni, hogy a fenyércirok, vagy másik nevén fehérccirok évelő gyomnövény, így a hideg időszakban a föld alatt pihenő gyöktörzsében telel át a vírus (Stewart és mtsai 2012).

A vírus pozitív, egyes szálú, hozzávetőlegesen 10 kb nagyságú RNS-genommal rendelkezik, mely közel 2000 fehérjéből álló fehérjeburokba van csomagolva (Salomon és Bernardi 1995, Urcuqui-Inchima és mtsai 2001). A vírus genomja egy hosszú, nyitott leolvasási keretet tartalmaz, melyről egyetlen 338 kDa nagyságú fehérje íródik át. Ez a későbbiekben 3 virális proteináz segítségével ko- és/vagy poszttranszlációs hasítások útján legalább 10, funkcióval rendelkező fehérjére bomlik (Achon és mtsai 2012, Gell és mtsai 2010). A vírus RNS 5'-végéhez kovalensen kapcsolódnak a VPg (viral genome-linked proteins) fehérjék, míg a 3'-terminális poliA-farokban végződik (Gell és mtsai 2010).

A vírus-köpenyfehérje számos funkciót lát el: körülveszi a vírus RNS-t, így védelemmel látja el, emellett fontos szerepet játszik a vírus szaporodásában és terjedésében a növényen belül. A fehérje C- és N-terminális részei a hajtogatódás eredményeképpen a felszínre kerülnek, aminek köszönhetően könnyebben tudnak más fehérjékkel vagy motívumokkal kapcsolatba lépni. A

köpenyfehérje középső része és a C-terminális régió a vírus RNS beburkolásában és a növényen belüli sejtről-sejtre történő mozgásában segédkeznek. A jóval variábilisabb N-terminális rész a növényen belüli hosszabb távú terjedésben játszik szerepet, illetve a fehérjerész tartalmaz egy diacil-glicerol-motívumot, ami a rovarvektor-vírus kapcsolat kialakulásához elengedhetetlen (Gell és mtsai 2010, 2011). Megfigyelték, hogy az N-terminális rész eltávolításával már nem tudják a levéltetvek terjesztetni a vírust, azonban mechanikai úton történő fertőzésnél sikeresen átjut a növénybe (Petrik és mtsai 2010).

Az MDMV rendszertani szempontból számos törzsre bontható. Az eltérő vírustörzsek hasonló köpenyfehérjével rendelkeznek, különbséget az N- és a C-terminális végeken lehet találni, mely egyben törzsi jelleg is. Mindegyik vírustörzsre jellemző, hogy a fertőzés során hengerszerű bemélyedések jelennek meg a citoplazmában, valamint jelentősen megnő az endoplazmatikus retikulumok és a kloroplasztiszok száma a fertőzött területen (Chen és mtsai 1994, Hammond 1998). A vírus az endoplazmatikus retikulumot elhagyva a kloroplasztiszba kerül, és ott membránbetűródések képződését okozza, melyekben lezajlik a replikációja (Chen és mtsai 1994, Mayhew és Ford 1974, Wei és mtsai 2010). Utóbbi folyamathoz RNS-függő RNS-polimerázokat igényel, továbbá saját és a gazdaszervezet fehérjéit is felhasználja (Lewsey és mtsai 2009). Az MDMV a sejtek között a plazmodezmákon keresztül, továbbá növényi szinten a xilém-elemekben terjed és a mozaikos tünetek mindig a levél tövében jelennek meg először (Chen és mtsai 1994, Choi 1999).

A fertőzéshez a vírusnak szüksége van két általa kódolt faktorra, valamint a köpenyfehérjére és egy segítő proteinázra (HC-Pro - *helper component proteinase*), mely utóbbi a gazdaspecifitásban, a rovarvektorral történő terjedésben, a vírus növényen belüli szaporodásában, a növényen belüli sejtről-sejtre történő mozgásban, a vírus-gazdaszervezet kapcsolat kialakításában, gazdaváltásban és az RNS-csendesítés leküzdésében játszik fontos szerepet (Achon és mtsai 2012). Az MDMV-A törzs kiemelkedik a többi törzs közül (MDMV-C, -D, -E és -F), ezt tekintik az MDMV típustörzsének.

1.2.3. A vírus mennyiségének kimutatása, változása különböző kezelések hatására

A hatékony növényvédelemhez fontos ismerni a vírusok szaporodását és mozgását a növényen belül. Az egyik leggyakrabban használt modellvírus a dohány mozaik vírus (*TMV* -

tobacco mosaic virus). Számos módszer ismert, melyek alkalmazásával megismerhetővé vált a vírusok növényen belüli aktivitása.

A szerológiai vizsgálatok alkalmazása vírusok jelenlétének kimutatására már régóta használt és széles körben elterjedt technika. A módszer érzékenysége abban rejlik, hogy a vírusfehérjéhez (általában köpenyfehérjéhez) szekvencia- vagy motívum-specifikusan kötnek antitestek, melyekhez enzim kapcsolható. Az enzim szubsztrátja hasítást követően elszínezi az oldatot, így vizuálisan vagy fotometriásan mérhető az elszíneződés mértéke, mely egyenes arányosságban van a vírus mennyiségével az adott mintában. Hátránya a módszernek, hogy magas víruskoncentrációt már nem tud számszerűsíteni a műszer, illetve az alacsony víruskoncentrációnál tévesen negatív eredményt adhat (Clark és Adams 1977, Edwards és Cooper 1985).

A molekuláris szintű vizsgálatok fejlődésével előtérbe kerültek olyan módszerek, melyek a vírus örökítőanyagát vagy géntermékét ismerik fel. Számos vírusnak ismert a DNS vagy RNS szekvenciája, így könnyűszerrel tervezhető rá PCR reakció, mellyel kimutatható a jelenléte egy növényi mintában. A PCR termék számos vizsgálathoz használható fel, így gélelektroforézissel agaróz vagy poliakrilamid gélen, vagy akár DNS chip technológiával hordozófelületen is kimutatható a vírus. A vírus mennyiségi meghatározásához kitűnő lehetőséget kínálnak a real-time PCR vizsgálatok, melyek az utóbbi pár évben lettek kedvelt eszközei a virológiai kutatásoknak. Hasonló elven működik a „fluoreszcens próba” is, mely molekula szekvenciaspecifikusan ismeri fel a vírus adott genomi szakaszát és az amplifikáció során egyre növekvő fluoreszcens jelet ad, így téve lehetővé kimutatását és kvantifikálását. Előnye a módszernek, hogy érzékeny, így már rendkívül kis mennyiségű virális eredetű nukleinsavat is képes kimutatni (Eun és Wong 2000, Hataya és mtsai 1994, Lee és mtsai 2003).

Hosszasan lehetne még sorolni a különböző technikákat, és naponta jelennek meg újabb publikációk, melyek bővítik a vírusok kutatásának tárházát. Minden vizsgálat rendelkezik pozitív és negatív tulajdonságokkal is, így nem lehet egyik módszert sem kiemelni a sok közül. Éppen ezért jelen értekezésben is két módszert alkalmaztam az MDMV kimutatására: egy szerológiai és egy PCR-alapú meghatározást, melyek együttes alkalmazásával részletgazdagabb információ kapható a vírus szaporodásáról és jelenlétéről a növényben.

1.3. A növény védekezése vírusfertőzés ellen

Vírusfertőzés során a növény számos módon próbálja gátolni a vírus terjedését. Ezek közül az egyik legismertebb út az RNS-csendesítés folyamata. A vírus többféle módon képes kikerülni a növény védekező mechanizmusát: a genomjának több pontján is virulencia faktorokat kódol, melyek a növényi RNS-csendesítés során számos komponenshez kapcsolódhatnak, ezáltal blokkolhatják azok működését, végső soron pedig csökkentik a gazdanövény védekezési hatékonyságát (Marathe és mtsai 2000, Pradeep és mtsai 2012, Wadsworth és Dunoyer 2009, Zhang és mtsai 2012).

Azon fehérjéket, melyek szerepet játszanak a növényi védelem kialakításában, összefoglalóan R (rezisztencia) fehérjéknek nevezik. A 14-3-3 fehérjecsaládba tartozó fehérjék fontos szerepet töltenek be az R-gén-mediált növényi rezisztencia kialakításában. A genomi DNS-en található, G-boksz (CACGTG) szabályozó elemekhez számos, a növényi stresszválaszban jelentős szerepet betöltő fehérje kötődik, melyeket G-boksz faktoroknak hívnak. A GF14-6 (G-boksz faktor 14-3-3 homológ) fehérje is ilyen G-boksz régióhoz köt, illetve számos faktort is képes kötni, melyek a védekezési útvonalakon fejtik ki hatásukat (Campo és mtsai 2012, Denison és mtsai 2011, Ruiz-Ferrer és Voinnet 2009, Uzarowska és mtsai 2009, de Vetten és Ferl 1994).

Az MDMV által termelt HC-Pro fehérjék fontosak a fertőzőképesség megtartásában, melyet a gazdanövény védekezőrendszerének a blokkolásán keresztül fejtenek ki. A fehérjék növényi rgs-CaM (kalmodulin-szerű fehérje) molekulákhoz kötnek, így gátolják azok működését. Az rgs-CaM fehérjék feladata a géncsendesítés fenntartása, de emellett csökkentik a virális eredetű kis RNS-ek metilációjának mértékét is. A két fehérje egymáshoz viszonyított aktivitása akár sejtenként is eltérő lehet, melynek köszönhetően nem tekinthető homogénnek a növényi védekezés. A folyamat eredményeképpen sejtről-sejtre változik a vírus koncentrációja, így a fertőzés során fellépő károsodás is eltérő méreteket ölthet. Ez a több szinten zajló fegyverkezési verseny alakítja ki az MDMV-fertőzésnél tapasztalható klorotikus mozaikosságot (Nakahara és mtsai 2012, Shibolet és mtsai 2007, Tadamura és mtsai 2012).

1.3.1. A fotoszintetikus rendszer védelme

A Napból származó sugárzás energiája a leveleket elérve 3 fő útvonalon hasznosulhat: részben a fotoszintézis folyamatát eredményező fotokémiai reakcióban, emellett a fotonok energiája hővé alakulhat hődisszipációs útvonalakon, illetve a klorofilok gerjesztését követően a fölös energia fluoreszcencia formájában jelenhet meg (Gilmore és Yamamoto 1991). A fluoreszcencia „fotokémiai kioltása” maga a fotokémiai reakció, míg azon kioltási útvonalakat, melyek során az elnyert energia nem a fotoszintetikus elektrontranszportláncban hasznosul, nem-fotokémiai kioltásnak hívjuk. Optimális fiziológiai körülmények mellett az energia fotokémiai reakcióban vezetődik el, mely CO₂-fixációra, illetve egyéb anyagcsere-folyamatokra fordítódik (Niyogi 2000).

A fotoszintézis épségének megőrzése életszükséglete a növénynek. Biotikus és abiotikus stresszek során több fényenergia éri a növényt, mint amennyit a fotoszintézisben hasznosítani tud, így ilyen körülmények között gyakran megfigyelhető a fotorendszerek károsodása, és a nem fotokémiai kioltás mértékének a növekedése (Buschmann 2007, Lichtenthaler és mtsai 1990). A növény számos módon képes a rendszer integritását megőrizni: antioxidáns molekulák és enzimek felhalmozásával, a lipidperoxidáció okozta károsodás kivédésével, a kettes fotokémiai rendszert (PS II) ért sérülések javításával, valamint az egész szervezetet érintő szignalizációs útvonalak aktiválása és akklimációs folyamatok beindítása révén (Niyogi 2000).

A *víz-víz ciklus* fontos szerepet játszik a fotorendszerek védelmében. Amikor fölös energia éri az egyes fotokémiai rendszert (PS I), elektronok kerülnek O₂ molekulákra, melyek O₂⁻-dá alakulnak. Ezeket a reaktív formákat a SOD alakítja át H₂O₂-dá, mely aszkorbinsav közvetítésével alakul tovább vízzé. Azért hívják *víz-víz ciklusnak* a folyamatot, mert a PS II vízbontó aktivitása révén keletkezett elektront használja fel a rendszer, hogy a molekuláris oxigént vízzé alakítsa a PS I-nél. A folyamat eltávolítja a rendszerből a fölös elektronokat, azonban működése során hozzájárul a pH-különbség (Δ pH) kialakításához is, mely fontos tényező a nem fotokémiai kioltásnál (Baker és Rosenqvist 2004, Niyogi 2000). A nem fotokémiai kioltás során fokozódnak a hő- és energiadisszipációs útvonalak, továbbá a Δ pH- és a xantofillciklus-alapú kioltás is erősödhet (Baker 2008).

A fölös fotonok hatására megnő a Δ pH mértéke, melynek eredményeképpen csökken a lumen pH-ja (Gilmore és Yamamoto 1991, Niyogi 2000). A nem fotokémiai kioltásban kulcsszerepet játszó fehérje, a PsbS (*photosystem II subunit S*, de CP 22 néven is ismert) érzékeli

a lumenben a pH változását, és szerkezetének megváltozása révén kötődik a PS II-höz kapcsolódó fénygyűjtő antennakomplexhez (LHC II) a membránban, talán pigmenteken keresztül, továbbá kapcsolatot létesít még protonokkal és zeaxantinnal is. A PS II LHC II részéhez kötődve változást okoz az alegységek szerkezetében, egymáshoz viszonyított helyzetében, melynek eredményeképpen szabadabb szerkezetet vesz fel. Ez a laza szerkezet elengedhetetlen a nem fotokémiai kioltás további folyamataihoz (Kereiche és mtsai 2010). A fehérje pigmentekkel kialakított kötődése még nem bizonyított, mivel tisztított PsbS nem tartalmazott klorofillt vagy karotinoidokat (Horton és Ruban 2005, Kereiche és mtsai 2010).

Emellett a pH csökkenésének eredményeképpen aktiválódik a violaxantin-dezepoxidáz (VDE) enzim is (pH 6,2 alatt). A VDE a membránhoz kötődik aktív formában. A pH-változás következtében az antennakomplexekből felszabadul a violaxantin, mely a VDE enzimmel kapcsolatba lépve anteraxantin intermediereken keresztül zeaxantinná alakul (Horton és Ruban 2005, Jahns és mtsai 2009). Az átalakulás során változik az LHC II konformációja: violaxantin helyett zeaxantin kötődik a fehérjéhez, így a kötőkönyezet változása az LHC II komplexben található fehérjék szerkezetére, és ennek köszönhetően funkciójára is kihat (Baker 2008, Pascal és mtsai 2005). A violaxantin-ciklus az összes magasabb rendű növényben és néhány zöldalgában is kimutatható. Magas fényintenzitáson zeaxantin halmozódik fel a növényben, ami delokalizált elektronszerkezetének köszönhetően hatékony kioltó molekula, míg alacsonyabb fényintenzitáson a zeaxantin visszaalakul violaxantinná zeaxantin-epoxidáz segítségével (pH 7,5 környékén) (Jahns és mtsai 2009). Ezt a folyamatot nevezzük *violaxantin-ciklusnak*.

1.3.2. A fenoloidszármazékok és szerepük a növényi védelemben

A legtöbb magasabb rendű növényben biotikus és abiotikus stresszek során számos védő hatású fenoloidszármazék halmozódik fel (pl. tanninok, flavonoidok, cinnamoidok) (Buschmann és mtsai 2000, Bürling és mtsai 2011, Treutter 2006). Az ismert fenoloidok fahéjsavból képződnek, ami fenilalaninból szintetizálódik a fenilalanin-ammóniáláz közvetítésével. Az egyszerű fenoloidok (melyek az alap C6-C3-as szénvázsal rendelkeznek) számos hidroxilációs, metilációs és dehidrációs reakció során alakulnak ki (Dixon és Paiva 1995).

A szabad fenoloidok számos vegyülettel alakítanak ki kapcsolatot. Ezek közé tartoznak a cukrok (pl. szalicilsav-glükóz konjugátum), sejtfalat felépítő szénhidrátok (pl. ferulasav-észterek), vagy akár szerves savak (pl. klorogénsav). A szalicilsav (SA) is fenoloidszármazéknak

tekinthető, hiszen a fahéjsavból képződik. Az SA fenilpropanoid bioszintézis útvonalban betöltött helyzetét igazolja, hogy fenilalanin-mutáns növényekben nem alakul ki a szisztémikus szerzett rezisztencia (*SAR – systemic acquired resistance*) (Dixon és Paiva 1995).

Számos fenoloid termelődése aktiválódik stressz hatására, de talán ezek közül is kiemelhetők a flavonoidok, melyek szintézisének első és egyben kulcsenzime a kalcon-szintáz (CHS). Az útvonal egy p-kumársav-koenzim A és három malonil-koenzim A kondenzációjával indul, ezt katalizálja a CHS. A legtöbb növény családban legelőször tetrahidroxikalkon keletkezik, melyből későbbi lépésekben alakulnak ki a flavonok, flavanonok, flavonolok, flavanok és antocianidinek. A flavonolok közül a kvercetin vagy a kaempferol említhetők meg. Sebzés hatására lokálisan megnő a flavonolok mennyisége a növényben (pl. kaempferol és glükozidjai) (Dixon és Paiva 1995, Khan és mtsai 2014).

A fenilpropanoid bioszintézis útvonal számos enzimére jellemző, hogy oldékonyak, ezért a citoplazmában találhatóak (pl. fenilalanin-ammóniáláz vagy CHS), de lazán membránstruktúrákhoz is kötődhetnek. Ezen enzimek kifejeződését számos gén szabályozza (Dixon és Paiva 1995).

A fenoloidok nagy része a kék, zöld vagy a sárga spektrális tartományban bocsájt ki fluoreszcenciát (Meyer és mtsai 2003). Számos, főleg hosszabb távú stressz hatás során emelkedik a zöldben fluoreszkáló fenoloidok mennyisége (pl. kvercetin és származékai) és így erősödik a zöld fluoreszcencia hozama (Buschmann és Lichtenthaler 1998). Ezen vegyületek felhalmozódása általános válaszreakciónak tekinthető biotikus és abiotikus stresszek során, mivel védelmet biztosítanak sejtkárosodás és reaktív oxigénformák ellen (Hideg és mtsai 2002, Hura és mtsai 2007, Meyer és mtsai 2003, Solti és mtsai 2014).

1.3.3. Az antioxidáns rendszer

Az RNS-csendesítés mechanizmusa mellett a növény reaktív oxigénformákat (pl. H_2O_2 , OH^- , 1O_2) is felszabadíthat, melyek több funkcióval rendelkezhetnek. Közvetlen módon támadhatják a bejutó kórokozót (OH^-), keresztököt alakítanak ki a sejtfalban található glikoproteinekkal, ami fizikai akadályt képezhet a behatoló terjedésével szemben, vagy akár másodlagos hírvivőként számos, a védekezésben szerepet játszó szignáltranszdukciós útvonalat aktiválhatnak (pl. hidroxilgyök, H_2O_2) (Fujita és mtsai 2006, Mittler 2017, Torres 2010). A reaktív oxigénformák a vírus mellett a gazdát is károsíthatják, ezért a növény saját védelmére

enzimeket (pl. szuperoxid-diszmutáz (SOD), glutation-S-transzferáz (GST), aszorbát-peroxidáz (APX), glutation-reduktáz (GR) vagy gvajakol-peroxidáz (GPX)), valamint gyökfogó tulajdonsággal rendelkező másodlagos anyagcseretermékeket állít elő (ferulasav komponensek, flavonoid származékok, stb.). Mindezek mellett érdemes megemlíteni az aszorbinsav és a karotinoidok gyökfogó tulajdonságait is.

1.3.3.1. A peroxidázok és szerepük a növényi védekezésben

A fotoszintetikus elektrontranszportlánc sérülése esetén a növényi sejtek kloroplasztiszaiban a molekuláris oxigén szuperoxid anion gyököket képezhet. Az így keletkezett gyököket a SOD víz jelenlétében semlegesíti, melynek eredményeképpen H_2O_2 szabadul fel. Fontos, hogy semlegesítve legyen a H_2O_2 a kloroplasztiszokban, mivel a CO_2 -redukciós ciklus számos enzime érzékeny a H_2O_2 -ra, és ezáltal a molekula képes gátolni a CO_2 -fixáció folyamatát. Ennek kivédésében segédkeznek a növényi peroxidázok, melyek számos úton képesek kifejteni védő hatásukat (Murata és mtsai 2012, Nakano és Asada 1981).

A növényi peroxidázokat hatásmechanizmusuk alapján két fő csoportba lehet sorolni. Az első csoportba olyan enzimek tartoznak, melyeknek feladata, hogy semlegesítsék a reaktív tulajdonságokkal rendelkező molekulákat (pl. H_2O_2). Ide sorolhatók többek között az APX és a GR. A másik csoportba azok a peroxidázok tartoznak, melyek terméke fontos fiziológiai szerepet tölt be: így részt vehetnek a lignin bioszintézisben, az indol-3-ecetsav bontásában, vagy az etilén termelésében. A második csoportba tartozó peroxidázok számos elektrondonort fel tudnak használni, azonban összefoglalóan GPX néven illetik őket, mivel esetükben (laborkörülmények között) a leggyakrabban felhasznált elektrondonor a gvajakol (Asada 1992).

Az APX a növényvilágban általánosan előforduló enzim, melynek feladata a kloroplasztiszok és a sejtek védelme a H_2O_2 károsító hatásaival szemben. Az enzim a sejten belüli komponensek oxidációja révén fejt ki védelmét:



ahol az AH_2 az elektrondonor és A a stabil, a reakció során keletkező oxidációs termék.

A reakció során monodehidroaszorbinsav keletkezik, melyből spontán módon aszorbinsav és dehidroaszorbinsav lesz. Emellett a monodehidroaszorbinsav NAD(P)H-függő útvonalon, a monodehidroaszorbinsav-reduktázzal is visszaalakulhat aszorbinsavvá. A dehidroaszorbinsav-reduktáz redukált glutationt (GSH) használ fel a dehidroaszorbinsav

bontásához, mely folyamat eredményeképpen aszkorbinsav szabadul fel (Asada 1992, Mittler 2002). A reakció folyamán a glutation oxidálódik, melynek a visszaállításában a GR segít, NAD(P)H-t felhasználva. Az aszkorbinsav-GSH ciklus mellett magasabb rendű növények kloroplasztiszaiban a víz-víz ciklus is részt vesz a reaktív oxigénformák közömbösítésében (Shigeoka és mtsai 2002).

Az APX izoenzimok előfordulhatnak a kloroplasztisz különböző részeiben, így a sztrómában, illetve a tilakoidokhoz kötődve. Ezek rövidebb életidejűek, de specifikusabban ismerik föl az aszkorbinsavat, mint a többi kompartment (mikrotestek, citoplazma, mitokondriális membrán) izoformái (Asada 1992, Shigeoka és mtsai 2002).

A GSH és a GR a növények kloroplasztiszaiban egyaránt előfordulnak. A GSH amellett, hogy tiol-csoportjai révén stabilizálja a Calvin-ciklus enzimeit, fontos szerepet játszik az aszkorbinsav szintjének fenntartásában. A GSH nem-enzimatis úton redukálja a dehidroaszkorbinsavat aszkorbinsavvá, melyhez enyhén lúgos közeget igényel (Foyer és Halliwell 1976).

A GPX-ok átfogó védelmet nyújtanak gomba- vagy bakteriális fertőzések ellen, és hozzájárulnak a sebek gyógyulásához. Számos izoformája előfordul a növényi szövetekben, így megtalálható a növényi sejtek vakuólumaiban, a sejtfalban vagy citoplazmában, viszont nem figyelhető meg a növényi sejtek organelumaiban (Asada 1992).

1.3.4. MDMV-fertőzés során magasabb expressziót mutató gének

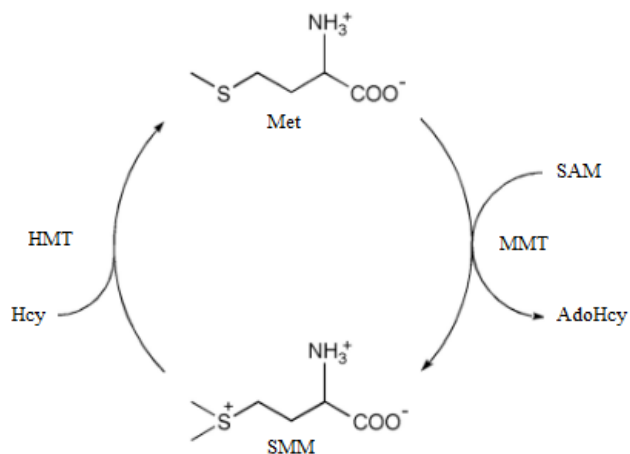
Uzarowska és mtsai (2009) számos gén változásait vizsgálták MDMV-fertőzött kukoricákban, hogy megismerjék a növény pontos válaszreakcióját. Munkájuk során meglepően kevés gént sikerült validálniuk, amely szignifikáns expressziós növekedést mutatott vírusfertőzés hatására. Ezek közül kettőt érdemes kiemelni: az *S-adenozilmetionin-szintáz (SAMS)* és a *GF14-6* gének változásait. A *SAMS* az *S-adenozilmetionin* szintézisében játszik fontos szerepet, mely molekula sejten belüli metilációs folyamatokhoz és védő hatású hormonok és vegyületek szintéziséhez járul hozzá (Peleman és mtsai 1989a). A *GF14-6* a 14-3-3 fehérjecsaládba tartozik, és kulcsszerepet játszik a foszforilációs folyamatok szabályozásában (de Boer és mtsai 2013). Emellett képes felismerni a virális köpenyfehérje egyes részeit, ami által fontos szerepet játszik a növényi védelem kialakításában (Campo és mtsai 2012, Chen és mtsai 2006, Konagaya és mtsai 2004).

1.4. Az S-metilmetionin (SMM) és szerepe a növényi védelemben

A növények biotikus és abiotikus stressztényezőkkel szembeni toleranciájának javítására a klasszikus nemesítési eljárások, valamint a transzgénikus növények előállítása mellett lehetőségként merül fel olyan természetes anyagok alkalmazása, melyek kedvező irányban befolyásolva a növény fiziológiai folyamatait, a védelmi potenciál növelését eredményezik (Zhang és mtsai 2011). Ilyen vegyület a növényekben általánosan előforduló S-metilmetionin is. Az S-metilmetionin (SMM, $[(\text{CH}_3)_2\text{-S-(CH}_2)_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}]$) egy természetben is előforduló, biológiailag aktív, nem proteinogén aminosav. 1954-ben írták le először káposztafélékben, azóta pedig az összes növény családban sikerült kimutatni jelenlétét (Bourgis és mtsai 1999, Giovanelli és mtsai 1980, McRorie és mtsai 1954, Sato és mtsai 1958).

Bourgis és mtsai (1999) igazolták, hogy az SMM jelentős szerepet játszik a redukált kén szállításában a floém elemekben. Búzában az SMM a levelekben keletkezik, majd a szállítónyalábokban a szemtermésbe transzportálódik, ahol metabolizálódik, átalakul metioninná és ezáltal vesz részt a fehérjeszintézisben és számos más folyamatban. A frissen szintetizált SMM a levelek apoplastikus régiójába kerül, ahonnan a szállítónyalábok veszik fel. Búzában a szemtermésbe érve az endospermiumba jut, ahol a táplálósövet és az embrió veszi fel belőle a számára nélkülözhetetlen metionint, ami végső soron a fehérjeszintéziséhez kell (Bourgis és mtsai 1999).

A növények levelében a vegyületek átalakulása metionin irányából SMM felé történik, míg a szemtermésben ezzel fordítottan, mely folyamat az SMM-ciklust eredményezi. Az SMM-ciklusban az SMM szintézise metioninból az S-adenozilmetionin:metionin S-metiltranszferáz (MMT) segítségével történik (Mudd és Datko 1990, Peleman és mtsai 1989b, Ranocha és mtsai 2001). Az enzim SMM mellett S-adenozilmetionint (SAM) is elfogad szubsztrátként, mely szintén fontos metildonor a növényi szervezetekben. Az S-metilmetionin:homocisztein S-metiltranszferáz (HMT) 1 mol SMM-ből és 1 mol homociszteiből (Hcy) 2 mol metionint szintetizál, így zárva be az SMM-ciklust (**1. ábra**).



1. ábra Az SMM-ciklus (Bourgis és mtsai 1999 alapján)

Kocsis és mtsai 2003-ban igazolták, hogy az SMM-ciklus egyik fő feladata a SAM megfelelő szinten tartása. A SAM szintézisében a SAMS vesz részt. Az SMM és SAM érzékeny egyensúlya is felelős a növény megfelelő védekezéséért (Ko és mtsai 2004, Rácz és mtsai 2008, Szegő és mtsai 2009).

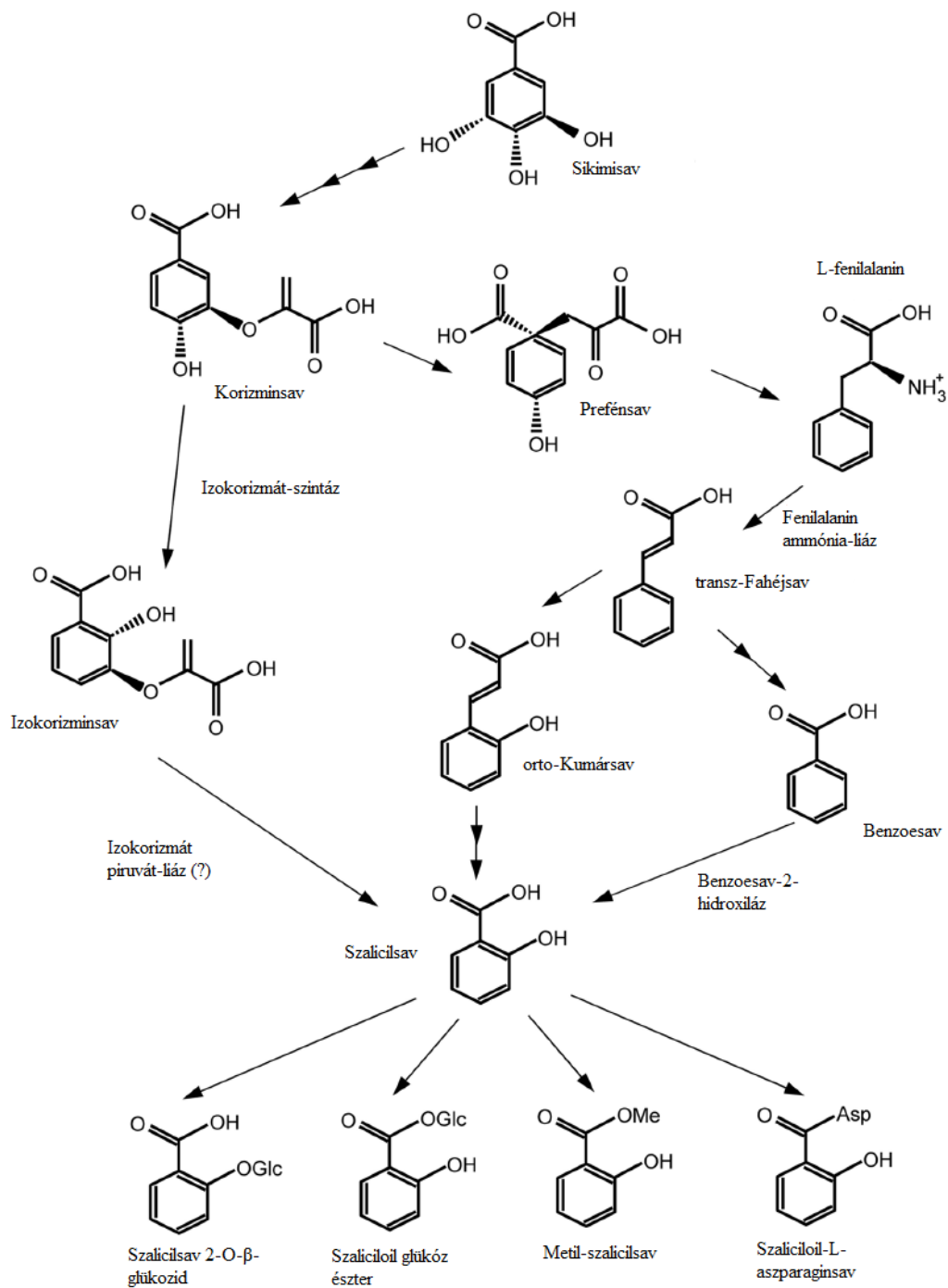
Az SMM fontos szerepet tölt be biotikus és abiotikus stresszorokkal szembeni védekezésben, mivel membránvédő szereppel rendelkezik, de emellett metildonorként befolyásolja az etilén-, valamint a poliamin-bioszintézis útvonalakat is (Bourgis és mtsai 1999, Ko és mtsai 2004).

1.5. A szalicilsav (SA) és védő hatása

A növények biotikus és abiotikus stresszorokkal szembeni védekezését a fitohormonok szabályozzák. Ide sorolhatók a jázmonsavak, az etilén, az abszcizinsav és az SA (Fujita és mtsai 2006).

Az SA fontos szerepet tölt be a növény védekezésében (Vicente és Plasencia 2011). Dohányban, uborkában és *Arabidopsis*-ban kimutatták, hogy fertőzés és UV-stressz hatására jelentősen nőtt az SA-tartalom (Dixon és Paiva 1995). Az SA fontos szignálmolekula, képződésével a SAR kialakulását eredményezi. Ezen az útvonalon a H_2O_2 a főbb jelátvivő molekula. A SAR során, ha egy növény idősebb leveleit patogén fertőzi, a fiatalabb levelekben rezisztencia alakulhat ki ugyanazon, vagy más kórokozó ismételt fertőzésével szemben. Az SA a floémában szállítódik és transzkripciós szinten szabályozza a védelemben szerepet játszó gének

kifejeződését (Dixon és Paiva 1995, Hayat és mtsai 2010). Az SA képződését és az anyagcsere-útvonalban betöltött szerepét a **2. ábra** mutatja.



2. ábra Az SA és szerepe az anyagcserében (Miura és Tada 2014 alapján)

Számos kísérlet igazolja az SA szerepét a növényi rezisztencia kialakításában. Transzgénikus dohányban a *Pseudomonas putida*-ból származó *nahG* gént termeltettek túl, melynek génterméke hidrolízissel bontja az SA-t. Az SA mennyisége jelentősen csökken ezekben a növényekben, aminek eredményeképpen nem alakul ki a SAR és avirulens fertőzést követően sem jelenik meg a rezisztencia (Dixon és Paiva 1995).

Egy másik kísérletben a karfiol mozaik vírus 35S (CaMV 35S) promóterének a szerepét vizsgálták. A promóter SA-függő kötőhelyet tartalmaz, ami azt sugallja, hogy a vírus a transzkripciójának szabályozásához a növényi védekezésben szerepet játszó szignált használja fel. Ezt támasztja alá, hogy SA-val gyorsan aktiválható a CaMV 35S promótere. Ezek a megfigyelések azt igazolják, hogy az SA érzékenyíteni képes a sejteket, melynek köszönhetően gyorsabb génexpressziós szabályozás érhető el fertőzés esetén (Dixon és Paiva 1995).

Tian és mtsai (2015) igazolták, hogy az SA megakadályozza a gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz kapcsolódását a *paradicsom bokros törpülés vírus* negatív szálú RNS-éhez, ezáltal gátolja a vírus szaporodását és így járul hozzá a növényi rezisztencia kialakulásához.

Az SA kis mennyiségben pozitívan hat a növények fotokémiai aktivitására, viszont magasabb koncentrációban már kárt okozhat. Növényfajonként és -fajtánként eltérő lehet az a koncentrációbeli küszöbérték, mely felett már megjelenik a vegyület károsító hatása, de befolyásolhatja ezt az értéket a növény kora is (Miura és Tada 2014). Például fiatal kukorica növényeknél 0,5 mM koncentrációban az SA károsodást okoz, viszont idősebb kukoricában hidegstressz során a vegyület azonos koncentrációban jótékonyan hat. Ezáltal látható, hogy nem csak a növény kora, hanem esetleges stresszorok megléte vagy hiánya is módosíthatja az SA hatásmechanizmusát (Janda és mtsai 2014). Ezeken túlmenően fontos, hogy az SA milyen molekuláris kölcsönhatásban vesz részt, hisz nátriumsó formájában adagolva (Na-szalicilát) más hatást fejt ki a növények antioxidáns rendszerére Cd-stressz során kukoricában, mint szabad formában (Gondor és mtsai 2016b).

2. Célkitűzések

Számos irodalmi forrásból ismert, hogy az SMM és az SA jótékonyan járul hozzá a növények fejlődéséhez és fokozzák védekezőképességét biotikus és abiotikus stresszorokkal szemben. Felmerült a kérdés, hogy miképpen lehetne ötvözni a két vegyület pozitív hatásait, és felvértetni a növényeket védelemmel. Ennek eredményeképpen kutatócsoportunk sikeresen létrehozott egy új vegyületet, az S-metilmetionin-szalicilátot (MMS), mely 1:1 arányban tartalmaz SMM-t és SA-t és egyúttal alkalmas a bomlékony SMM stabilizására is. Ezáltal kísérleteim során egyetlen vegyület hozzáadásával tudtam vizsgálni mind a két molekula hatását.

- ☞ Munkám során célom volt, hogy feltérképezsem a vírus eloszlásbeli és mennyiségi változásait SMM- és MMS-előkezelések hatására, így megállapíthassam, hogy az előkezelések hatására csökken-e, vagy változik-e a vírus növényen belüli eloszlása.
- ☞ Célom volt feltérképezni a növény fotoszintetikus rendszerének az épségét és a klorofilltartalom változásait, hogy kimutathassam, hogy a vírusfertőzés során fellépő károsodások kivédhetők vagy mérsékelhetők-e az előkezelésekkel.
- ☞ Vizsgáltam a fenilpropanoid bioszintézis útvonal aktivitását és a fenoloidok mennyiségi eloszlását különböző növényi részekben, hogy igazolhassam a védő hatású vegyületek termelődésének a fokozódását az előkezelések hatására.
- ☞ Mértem az antioxidáns rendszer változását, hogy kimutathassam az előkezelések hatását a növényi védekezőrendszerre.
- ☞ Vizsgáltam továbbá a *GFI4-6* és a *SAMS* génexpressziós változásait, hogy vírusfertőzés során valóban nő-e az expressziójuk, illetve hogy ezt miképpen módosítják az előkezelések.
- ☞ Emellett arra a kérdésre is kerestem a választ, hogy a vegyületek okoznak-e károsodást a növényekben, illetve hogy az MMS miben fejt ki más hatást, mind az SMM vagy az SA?

Az eredmények fényében lehetővé válhat az SMM vagy az MMS alkalmazása a növényvédelemben, mellyel természetes módon növelhető a növény védekezési potenciálja anélkül, hogy ezzel károsítanánk a környezetünket vagy az élőlények egészségét.

3. Anyagok és módszerek

3.1. A növénynevelés körülményei

Kísérleteim elvégzéséhez csemegekukoricákat használtam (*Zea mays* cv. *saccharata* var. Honey Koern., illetve var. Jubilee). A csíráztatáshoz a kukoricaszemeket 6 %-os H_2O_2 oldatban áztattam két órán keresztül, majd további két órára áramló desztilláltvízes közegbe tettem őket. A mosást követően alkohollal előre kisterilezett, majd desztillált vízzel átnedvesített papírvattával és szűrőpapírral bélelt petricsészébe helyeztem őket. 72 órát csíráztak a szemek a petricsészében, majd ezt követően 800 ml-es főzőpoharakba ültettem ki őket. A rácsokat alulról fekete színű lappal fedtem, illetve a főzőpoharakat alufóliával fedtem be, hogy a tápoldat ne algásodjon a fény hatására. SANYO MLR-350 HT (SANYO Electric Co., Ltd., Japán) növénynevelő kamrában neveltem a növényeket 25/23 °C, 14/10 óra világos/sötét periódussal, 300 μmol (foton) / $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ megvilágítás és 70 % relatív páratartalom mellett. Egy főzőpohárba maximum 5 kukorica csíranövényt ültettem.

Munkám során 6 kezelési csoporttal dolgoztam:

- ☞ *Kontroll növények csoportja*: A növényeket a fent említett kísérleti beállítások szerint neveltem.
- ☞ *SMM-kezelt növények csoportja (smm)*: Stresszmentes körülmények között nevelt, SMM-kezelést kapott kukoricák.
- ☞ *MMS-kezelt növények csoportja (mms)*: Hasonlóan, mint az *smm* csoport esetében, ezeket a kukoricákat is stresszmentes körülmények között neveltem, viszont ők MMS-kezelést kaptak.
- ☞ *MDMV-fertőzött növények csoportja (mdmv)*: A növényeket MDMV-vel fertőztem.
- ☞ *SMM-előkezelt fertőzött növények csoportja (smm+mdmv)*: A növényeket a fertőzést megelőzően SMM-mel kezeltem.
- ☞ *MMS-előkezelt fertőzött növények csoportja (mms+mdmv)*: A növényeket a fertőzést megelőzően MMS-sel kezeltem.

A növényeket emelt vastartalmú, módosított ($\frac{1}{4}$ -es) Hoagland-tápoldaton neveltem Hoagland és Arnon (1938) alapján.

A kezeléseket követő 1., 2. és 3. héten vettem mintát a növényekből a mérések elvégzéséhez.

3.2. SMM- és MMS-kezelés menete

Az SMM- és MMS-kezeléseket egyaránt 10 nappal a csírázást követően végeztem el. Mind a két vegyületet 0,5 mM koncentrációban adtam a növények tápoldatához, melyen 24 óráig neveltem a növényeket. Ezt követően a normál növényneveléshez használt ¼ Hoagland tápoldatra helyeztem vissza őket.

3.3. MDMV-fertőzés kivitelezése

A fertőzésre szánt növényeket 11 és 13 nappal a csírázást követően MDMV-A Dallas törzsszel fertőztem. A fertőzéshez használt vírustörzset az MTA ATK Növényvédelmi Intézet munkatársa, Almási Asztéria bocsátotta rendelkezésemre. A növények ilyen idősön már 3-4 levéllel rendelkeznek, és előkísérleteim, illetve szakirodalmi források alapján ekkor már hatékonyan fertőzhetők a vírussal. A fertőzés során a növények 1. és 2. leveleit fertőztem mind a két nap alkalmával. Az inokulum elkészítéséhez 1 g (friss tömeg) tünetes levelet 10 ml Sörensen-féle foszfát pufferben (**1. táblázat**), kevés karborundum hozzáadásával jégen eldörzsöltem, majd ezzel a homogenátummal dörzsöltem be a fertőzésre szánt leveleket (Friedt 1983). Ez a mennyiségű inokulum hozzávetőlegesen 60-75 kukorica fertőzésére elegendő. A vírusfertőzés tünetei legkorábban már 3 nappal a második fertőzés után láthatóak.

1. táblázat A fertőzéshez használt Sörensen-féle foszfát puffer bemérési táblázata

Összetevő	Tömeg (g)	Térfogat (ml)
KH ₂ PO ₄	3,631	400
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	7,122	600
Összesen:		1000

3.4. Enzimmötött immunszorbens vizsgálat (ELISA) leírása

Az MDMV köpenyfehérje mennyiségének meghatározásához ELISA technikát használtam (Clark és Adams 1977). A módszer ismertetése:

- ☞ IgG molekulákat (Bioreba AG, Reinach, Svájc) 1000-szeresre hígítottam bevonó pufferrel. Minden zsebbe 200 µl-t mértem be. A zsebeket lefedtem, majd 30 °C-on 4 óráig inkubáltam őket. Az inkubációs idő letelte után mosó pufferrel kimostam a zsebeket.
- ☞ A következő lépésben az antigén kötődik a növényi extraktumban levő vírus köpenyfehérjéhez. A növényi mintákat 1:20 arányban eldörzsöltem a kinyerő pufferben, majd ebből a homogenizátumból 200 µl-t mértem minden zsebbe. A bemérést követően lefedtem a zsebeket, majd 4-6 °C-on egy éjszakán keresztül inkubáltam. Ezt követően alaposan kimostam a zsebeket mosó pufferrel.
- ☞ Az így kikötött vírus köpenyfehérjéhez enzimkötött antitestet adtam. Az antitestet 1000-szeresre hígítottam a konjugáló pufferben (megegyezik a kinyerő pufferrel), majd 200 µl-t mértem minden zsebbe. Lefedtem a zsebeket, majd 30 °C-on 5 órán keresztül inkubáltam. Az idő letelte után mosó pufferrel kimostam a zsebeket, hogy a felesleges, ki nem kötött antitesteket eltávolítsam a rendszerből.
- ☞ Végül az enzim szubsztrátját is hozzáadtam a zsebekhez. Para-nitrofenil-foszfátot oldottam fel (1 mg/ml) szubsztrát pufferben, majd ebből 200 µl-t mértem minden zsebbe. Szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltam a lemezeket, majd fél óra elteltével ELISA Reader (Labsystem Multiscan MS spektrofotométer) segítségével 405 nm-en megmértem az elszíneződés mértékét.

A mért elszíneződés egyenes arányosságban van a mintában jelenlevő vírus-köpenyfehérje mennyiségével. A különböző pufferek elkészítéséhez az alábbi recepteket használtam a gyártó utasításai szerint:

- ☞ Bevonó puffer: 0,8 g Na_2CO_3 + 1,5 g NaHCO_3 ; 1 liter végtérfogatra hígítva, pH 9,6.
- ☞ Mosó puffer: 40 g NaCl + 14,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ + 1 g KH_2PO_4 + 1 g KCl + 2,5 ml Tween 20; 1 liter végtérfogatra hígítva, pH 7,2- 7,4.
- ☞ Kinyerő/Konjugáló puffer: 20 g polivinil-pirrolidon (viscosity K10-K40) + 2 g szarvasmarha szérum albumin + mosó puffer formula; 1 liter végtérfogatra hígítva, pH 7,4.
- ☞ Szubsztrát puffer: 97 ml dietanol-amin + 0,2 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 1 liter végtérfogatra hígítva; pH 9,8.

3.5. A klorofilltartalom meghatározása

A klorofilltartalom meghatározásához Porra és mtsai (1989) acetonos kinyerési módszerét használtam fel. A leveleket 1 cm átmérőjű dugófúróval korongoztam ki, majd mintánként 4-4 korongot dörzsmozsárban, 10 ml, ammóniát is tartalmazó (1,5 µl / ml) 80 %-os acetonnal eldörzsöltem. Az így kapott homogenizátumot centrifugacsövekbe öntöttem, majd 10 000 g-n 15 percig centrifugáltam. A felülúszót osztott kémcsövekbe öntöttem, majd a centrifugálás során elpárolgott acetont 10 ml végtérfogatra pótoltam. A mintákat végig sötétben és jégen tároltam, hogy lassítsam a klorofillmolekulák bomlásának a sebességét. A méréshez 1 cm átmérőjű kvarcküvetát használtam, és a minta fényelnyelését LAMBDA 25 UV-VIS spektrofotométeren (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) mértem meg 646,6, 663,6 és 730 nm-en.

730 nm-en a klorofillmolekuláknak nincs elnyelése, így az extinkcióérték a fényszórásból adódik. Az így mért extinkcióértéket felhasználva iránytangens számolható, mellyel korrigálhatóak a 646,6 és 663,6 nm-en mért extinkcióértékek. A kapott korrigált intenzitásadatokról az alábbi egyenletek alapján összklorofill-tartalmat számoltam (Porra és mtsai 1989 alapján):

$$\text{klorofill-a } (\mu\text{g/g}) = (12,25 * (E_{663,6} - E_{730} / 70 * 136,4) - 2,55 * (E_{646,6} - E_{730} / 70 * 153,4)) \\ * \text{ térfogat (ml) } * \text{ hígítás / tömeg (g)}$$

$$\text{klorofill-b } (\mu\text{g/g}) = (20,31 * (E_{646,6} - E_{730} / 70 * 153,4) - 4,91 * (E_{663,6} - E_{730} / 70 * 136,4)) \\ * \text{ térfogat (ml) } * \text{ hígítás / tömeg (g)}$$

Az így kapott értékeket egységnyi levélfelületre vonatkoztatva adtam meg:

$$\mu\text{g/cm}^2 = (\text{klorofill-a} + \text{klorofill-b}) / \text{felület (cm}^2\text{)} * \text{tömeg (g)}$$

3.6. A nem-fotokémiai kioltás komponenseinek mérése

A klorofill fluoreszcenciát és a nem fotokémiai kioltást nem invazív módszerrel, pulzus amplitúdó modulációs készülékkel (PAM 101-102-103, Waltz, Effeltrich, Németország) mértem, mely 705 és 740 nm között regisztrálja a klorofillmolekulák fluoreszcenciáját. A leveleket a mérés előtt 15 percig sötétadaptáltam, hogy a PS II reakciócentrumok nyitott állapotban legyenek. Szakirodalmi forrásokban 20, de akár 45 perces sötétadaptációt is találtam, viszont tapasztalataink alapján negyed óra is elég volt a tökéletes sötétadaptáláshoz (Hendrickson és

mtsai 2005, Lichtenthaler és mtsai 2005). A mérés során a levelek abaxiális oldalát mértem a PAM készülékkel, mert ott mérhető maximális fluoreszcencia szövettani adottságokból kifolyólag. A mintákat először alacsony intenzitású vörös (1,6 kHz, 650 nm), majd szaturációs fénnel (100-200 ms) rövid ideig megvilágítottam, az előbbi során az F_0 (minimális, vagy kezdeti fluoreszcencia), míg az utóbbival az F_m (maximális fluoreszcencia) adatokat regisztrálta a műszer. Ezekből a paraméterekből számolható ki az F_v/F_m hányados (F_v - változó fluoreszcencia), mely kifejezi a PS II maximális kvantumhatékonyságát, egyúttal jól jellemzi a növény aktuális élettani állapotát (Baker és Rosenqvist 2004, Lichtenthaler és mtsai 2005).

$$F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$$

Ezt követően folyamatos aktinikus fénnel (650 - 655 nm) világítottam meg a leveleket, majd 100 másodpercenként gyenge távoli vörös fényfelvillanásokat adtam. Az adatokat minden fényfelvillanásnál regisztrálta a műszer, és egészen addig adtam fényfelvillanásokat, amíg az F_m' érték (fényadaptált állapotban mért maximális fluoreszcencia) állandó nem lett. Ezt követően lekapcsoltam az aktinikus fényt, és sötétben gyenge, távoli vörös fényt kapcsoltam fel néhány másodpercig.

Ezután visszakapcsoltam vörösbe a hullámhossztartományt, majd szaturációs felvillanásokat adtam a leveleknek (20 másodperc, 5 és 10 perc elteltével). A mérés során a nem fotokémiai kioltás mértékét határoztam meg. A mérőműszer folyamatosan monitorozta az alábbi paramétereket: F_0 , F_m , F_0' , F_m' , F_t , $F_{md}20''$, $F_{md}5'$, $F_{md}10'$ és F_m'' . Kísérletem során az alábbi paramétereket vizsgáltam:

☞ a ΔpH és xantofill ciklus-alapú kioltást:

$$\Phi_{NPQ} = ((F_t/F_m') - (F_t/F_m)) * (F_v/F_m / F_v/F_{mM})$$

☞ a fluoreszcencia alapú- és konstitutív hődisszipációt:

$$\Phi_{f,D} = (F_t/F_m) * (F_v/F_m / F_v/F_{mM})$$

☞ az aktív PS II reakciócentrumok hatékonyságát:

$$\Phi_{PS II} = (1 - F_t/F_m') * (F_v/F_m / F_v/F_{mM})$$

☞ az inaktíválódott PS II reakciócentrumok hődisszipációját:

$$\Phi_{NF} = 1 - (\Phi_{NPQ} + \Phi_{f,D} + \Phi_{PS II})$$

☞ a ΔpH -függő kioltást:

$$qE = ((F_m - F_{md} 20'') - (F_m - F_{md} 5')) / (F_m - F_0)$$

☞ state-tranzíció függő kioltást:

$$qT = ((F_m - F_{md} 5') - (F_m - F_{md} 15')) / (F_m - F_0)$$

☞ a fotoszintézis fotoinhibícióját:

$$qI = (F_m - F_{md} 15') / (F_m - F_0).$$

Az egyenletben szereplő F_{mM} értékhez a legjobb paraméterekkel rendelkező *kontroll* növény F_m értékét használtam fel. A fenti egyenletek és a módszer Baker (2008) és Lichtenthaler és Mtsai (2005) munkáiból származnak.

3.7. A fluoreszcencia-leképezés menete

A fluoreszcencia-leképezéshez FL-FIS (compact flash-lamp fluorescence imaging system) rendszert használtam. A mérőműszer 355 nm-es UV-fénnyel (xenon lámpa; Schott, Mainz, Németország) gerjeszti a növényi mintát, melyet 4 szűrővel (440, 520, 690 és 740 nm) ellátott CCD kamera regisztrál (tárgylencse: Nikon-AF Nikkor, Japán, 1:1.4 D, 50 mm átmérő). A kis intenzitású fluoreszcens jelek felerősítése több száz kép összegzésével történik, melyet a Camille1.04 programmal (Photonetics, Kehl, Németország) végeztem el. Az adatok kiértékeléséhez a Camille1.05 (Photonetics, Kehl, Németország) programot használtam. Az intenzitásértékek felvételéhez a levél mentén több négyzet alakú területet jelöltem ki, és a számolásokhoz ezen területek intenzitásértékeit átlagoltam. Az eredmények értékelésénél a 440 és 520 nm-en kibocsájtott fluoreszcencia értékeket használtam fel (Szigeti 2008).

3.8. Az összfenoloid-tartalom meghatározása fotometriás módszerrel

Kísérleteim során az összfenoloid-tartalom meghatározást fotometriásan végeztem (LAMBDA 25 UV-VIS spektrofotométer, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA, USA). A növényi levelekből 0,5 g-ot, míg a szárazból 5-5 cm-t tettem el kinyeréshez. A mintákat 5 ml sósavas metanollal (MeOH:H₂O:HCl 79:20:1 elegye) eldörzsöltem, majd a homogenizátumot centrifugacsövekbe öntöttem. 10 percig 15 000 g-n centrifugáltam, majd osztott kémcsőbe öntöttem a felülúszókat és sósavas metanollal 5 ml-re kiegészítettem őket.

A fotometriás mérés előtt a mintákat 20-szorosra hígítottam, majd 4 hullámhosszon megmértem a fényelnyelésüket (254, 270, 290 és 300 nm-en). Az összfenoloid-tartalmat galluszsav ekvivalensben fejeztem ki az alábbi egyenlet felhasználásával:

$$\text{mért abszorbancia érték} = 1,1347 * \text{koncentráció } (\mu\text{M}) - 1,2332 ,$$

ahol a mért abszorbanca érték a 4 hullámhosszon mért fényelnyelési értékek átlaga, és a koncentráció a keresett összfenoloid-tartalmat fejezi ki (Páldi és mtsai 2014, Teklemariam és Blake 2004).

3.9. Enzimkinetikai vizsgálatok leírása

A növényi védekezés feltérképezéséhez számos antioxidáns enzim aktivitását követtem figyelemmel. A méréseket LAMBDA 25 UV-VIS spektrofotométeren (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA, USA) végeztem.

3.9.1. Kinyerő puffer elkészítése, a kinyerés menete

Az enzimkinetikai vizsgálatokhoz a növények leveleiből és gyökeréből vettem mintákat 1, 2 és 3 héttel a fertőzéseket követően. A kinyerésnél 0,5 g növényi részből indultam ki. A gyökereket a mérés előtt szűrőpapírral leitattam a pontos mérés érdekében. A kimért növényi mintákat folyékony nitrogénben porrá dörzsöltem. Jégen tartott 2,5 ml kinyerő pufferben felkevertem ezt a port és 5 ml-es centrifugacsövekbe töltöttem. A kinyerő puffer receptjét a **2. táblázat** tartalmazza. A pufferben levő mintákat 20 percig 15 000 g-n centrifugáltam, majd 1,5 ml-es Eppendorf-csövekbe pipettáztam át a felülúszót, és rögtön folyékony nitrogénbe tettem, hogy pillanatszerűen megfagyjon. A fehérjék rendkívül gyorsan bomlanak, ezért fontos, hogy mindig jégen vagy fagyott állapotban tartsuk a mintákat. A feldolgozásig -80 °C-on tároltam az enzimeket. Minden mérés során szűkített, 750 µl-es kvarcküvetéket használtam. Az enzimkinetikai mérések előtt megmértem minden minta összfehérje-tartalmát az alábbi egyenlet szerint:

$$\text{összfehérje-tartalom} = (1,55 A_{280} - 0,76 A_{260})/1000 \text{ (g/ml)},$$

ahol A_{280} és A_{260} a 280 és 260 nm-es hullámhosszakon mért elnyelései a mintáknak. Ezzel a fehérjetartalommal normálva fejeztem ki az enzimkinetikai adatokat.

2. táblázat Az enzimkinyeréshez használt kinyerő puffer receptje

Anyag	Koncentráció (100 ml végtérfogatban)
Trisz - HCl puffer pH 7,4	0,5 mM
MgCl ₂	3 mM
EDTA	1 mM

3.9.2. Az APX enzimaktivitás mérése

A vizsgálat során 290 nm-es hullámhosszon követtem nyomon a redukált aszkorbát fogyását 2 percen keresztül. A **3. táblázat** tartalmazza az összemérési táblázatot (Nazarli és mtsai 2011 munkája alapján).

3. táblázat Az APX enzimaktivitásának méréséhez használt anyagok és mennyiségük

	Anyag	Mennyiség
Mérőműszer nullázásához	desztillált víz	534 µl
	1 M Trisz puffer pH 7,8	150 µl
	0,04 M aszkorbinsav	7,5 µl
Reakció indításához	0,1 mM EDTA	0,75 µl
	0,1 M H ₂ O ₂	7,5 µl
	enzimminta	50 µl

3.9.3. A GR enzimaktivitás meghatározása

Az enzimreakció során redukált GSH keletkezik, melynek mennyiségi változásait fotometriáson, 412 nm-es hullámhosszon monitoroztam 2 percen keresztül. A reakció összetételét a **4. táblázat** tartalmazza (Madamanchi és Alscher 1991 alapján).

4. táblázat A GR enzimaktivitásának összemérési táblázata

	Anyag	Mennyiség
Mérőműszer nullázásához	0,5 M Na-foszfát puffer pH 7,5	150 µl
	1 mM DTPA *	150 µl
	2 mM DTNB **	375 µl
	8,4 mM NADPH	11,9 µl
	50 mM GSSG ***	20 µl
	desztillált víz	193 µl
Reakció indításához	enzimminta	100 µl

* DTPA = dietilén-triamin-pentaecetsav

** DTNB = 5,5'-ditiobisz-2-nitrobenzosav

*** GSSG = oxidált glutation-diszulfid

3.9.4. A GPX enzimaktivitásának mérése

Az enzimreakció során a gvajakolból tetrakonjugátum keletkezik, melynek a képződését 470 nm-es hullámhosszon 2 percen keresztül mértem. A reakció receptjét az **5. táblázat** tartalmazza (Nazarli és mtsai 2011 munkája alapján).

5. táblázat A GPX enzimaktivitásának vizsgálata

	Anyag	Mennyiség
Mérőműszer nullázásához	reakciópuffer *	375 µl
	desztillált víz	243 µl
Reakció indításához	0,1 mM EDTA	0,75 µl
	0,1 M H ₂ O ₂	112,5 µl
	enzimminta	18,75 µl

* A reakciópuffer receptje: 0,2 M Na-foszfát puffer pH 7 + 0,01 M gvajakol. 100 ml végtérfogatban.

3.10. RNS-kinyerés és cDNS-átírás

Az RNS-kinyeréshez ZR Plant RNA MiniPrep™ 2024 (Zymo Research, Irvine, CA, USA) kinyerő kitet használtam, a gyártó utasításai szerint. Mintákat a növények leveléből, szárából és gyökeréből is vettem. A gyökerekről a kinyerés előtt szűrőpapírral leitatam a tápoldatot, a pontos tömegmérés végett.

A kinyerés során kapott RNS-eket cDNS-sé írtam át, melyhez RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) kitet használtam, szintén a gyártó utasításainak megfelelően. A szintézishez random hexamer oligonukleotid szakaszokat (primereket) használtam, hogy a vírus RNS-t is nagy hatékonysággal tudjam felszaporítani a mintában. Az átírt cDNS-eket -20 °C-on tároltam felhasználásig. A PCR reakciókhoz 25-szörösre hígítottam a cDNS-eket.

3.11. Real-time PCR technikák

Munkám során számos gén expressziós változásait vizsgáltam, melyhez kvantitatív real-time PCR (qRT-PCR) technikát alkalmaztam. A kísérleteket ABI StepOnePlus™ Real-Time PCR System készüléken (Life Technologies, Foster, CA, USA) végeztem. Kétféle módszertani megközelítéssel is dolgoztam, nevezetesen relatív és abszolút kvantifikációs eljárásokkal. Az előbbihez SYBR Green I DNS-kötő festéket használtam, és a vizsgált gének expressziós változásait belső referenciagénekhez képest mértem. Az utóbbi módszernél fluoreszcens jelölésű hibridizációs próbát használtam. Ez a próba egyes szálú DNS, amely komplementer a célszekvenciával és egy mérendő (riporter) és két kioltó fluorofórt hordoz. A célszekvenciához kötve a kioltó fluorofórok elnyelik a mérendő fluoreszcenciát, azonban amikor az amplifikáció során a célszekvenciával szemben felépül a második DNS-szál, a próba leemésztődik, a riporter fluorofór szabaddá válik és fluoreszcenciáját érzékeli a mérőműszer. Ez a módszer érzékenyebb detektálást tesz lehetővé és használatával abszolút kvantifikálás érhető el.

3.11.1. Relatív qRT-PCR SYBR Green I festékkel

Ezzel a módszerrel növényi gének expressziós változásait vizsgáltam. A számolásokhoz két referenciagén expressziós adatainak geometriai átlagával korrigáltam. A reakciók összemérését a **6. táblázat**, míg a vizsgált génekre tervezett primerek adatait a **7. táblázat** tartalmazza.

6. táblázat A relatív qRT-PCR reakciók során használt összemérési táblázat, illetve a reakció paraméterei

Anyag	Mennyiség (1 reakcióelegyre)
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix	10 µl
(2x)*	
bal és jobb oldali primerek (10 µM)	0,5 – 0,5 µl
ultratiszta víz	5 µl
25-szörösre hígított cDNS (vagy ultratiszta víz negatív kontrollnál)	4 µl
A reakció paraméterei	
95 °C	10 perc
95 °C ^a	15 másodperc
60 °C ^a	15 másodperc
72 °C ^{**a}	30 másodperc
olvasáspont-elemzés:	
95 °C	15 másodperc
60 °C	1 perc
	+ 0,3 °C-onként mintavétel ^{**}
95 °C ^{**}	15 másodperc

* ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA, ** Ezeknél a lépéseknél detektált a műszer, ^a 40 cikluson keresztül ismétlődött ez a 3 lépés a reakció folyamán.

7. táblázat A reakció során használt primerek

Gén neve	Szekvencia (5' → 3')	Adatbázis azonosító	Hatékonyság
<i>aktin</i> ^{L,Sz,Gy}	ZMAF429: CGCTAGTGGGCGAACAACT ZMAR520x: CGCATGAGGAAGTGTGTATCC	GenBank: J01238	1,983
<i>membrán fehérje</i> <i>PB1A10.07c</i> (<i>MEP</i>) ^{L,Sz,Gy}	MEPF607: TTCCTCATGTTCTTCGTGCC MEPR737: CAGTTCTCATTCATCCGTG	MaizeGDB: AY105120.1	1,994
<i>CHS</i> ^{L,Sz}	ZMCF349: GCCGACTACCCGGACTACTA ZMCR450x: CTGCGGATCATCGACTTGT	GenBank: NM_001148774	1,990
<i>fahéjsav-4-hidroxiláz</i> (<i>C4H</i>) ^{L,Sz}	ZMCHF921: GCGTAAGAAGGTGATGGCTC ZMCHR1091: AGGAGGTTGTCGTGGTTGAT	GenBank: BT039467	1,986
<i>GF14-6</i> ^L	GFF372: AGAGCAATGTCCTGGGCAG GFR485: CAAGATGAAGGGTGATTACTAC	GenBank: BG836057	1,994
<i>SAMS</i> ^L	SAMSF480: CATTGAGCAGCAGTCCCCT SAMSR597: GGTCCTCGTCAGTCGCATAC	GenBank: BT054969	1,996
<i>APX (ZmAPX1.2)</i> ^{L,Gy}	ZAPF741: CGCCCTCTTGTGGAGAAATA ZAPR848: GACCATTTAAGCATCAGCATACC	GenBank: BT085996.2	1,994
<i>GR (GR1)</i> ^{L,Gy}	ZGRF701: GGAACCTACCAAACCAGATTA ZGRR825: GGCAACGAAGACATCAACATC	GenBank: AJ006055	1,996
<i>GPX (ZmPRX70)</i> ^{L,Gy}	ZmGPX669F: AATGACACCGAAGCCCTCAAC ZmGPX780R: AAACGGAGAGCACGACCAGG	GenBank: AFW77214	1,992

^L levélben, ^{Sz} szárban, ^{Gy} gyökérben mérve. Referenciagének: *aktin* és *mep*.

Az enzimkinetikai vizsgálatok során az antioxidáns enzimek összes izoformájának együttesen vizsgáltam a változását, míg a qRT-PCR vizsgálatoknál csak egyes izoformák génexpressziós változását követtem nyomon (7. táblázat).

A reakció hatékonyságának számolásához a tömény cDNS-oldatból 25-szörös hígítást készítettem (ez volt a legtöményebb oldat). Ezt követően 3-szoros hígítással 5 hígítási lépést hoztam létre. A kapott C_T adatokat logaritmikus skálán ábrázoltam, majd egyenest illesztettem rájuk, melynek meredekségéből számítható a reakcióhatékonyság (E) a következő egyenlet

szerint: $E=3^{(-1/\text{meredekség})}+1$. A relatív értékek meghatározásához Pfaffl-módszerrel számoltam (Pfaffl 2001).

3.11.2. Abszolút qRT-PCR hibridizációs próbával

Ezt a technikát a vírus RNS mennyiségi meghatározásához alkalmaztam. A SYBR Green festéken alapuló eljárás nem volt elég érzékeny a vsRNS kimutatásához, ezért tértem át a hibridizációs próba alapú módszerre. A reakció paramétereit a **8. táblázat** tartalmazza.

8. táblázat Az abszolút qRT-PCR reakció összemérési táblázata és a reakciókörülmények beállításai

Anyag	Mennyiség (1 reakcióelegyre)
2,5 µM PrimeTime™ próba*	2 µl
GoTaq Probe qPCR® Master Mix**	10 µl
25-szörös hígítású cDNS	6 µl
500 nmol bal és jobb oldali primerek	1-1 µl
5'-/56-	
PrimeTime™ próba szekvenciája***:	FAM/GCTCAAAGG/ZEN/AAGGTGGAACGGAGA/3IABkFQ/-
	3'
Bal oldali primerszekvencia:***	CACCAAGGCTTAGATTCCAC
Jobb oldali primerszekvencia:***	ACCAAAGCATCAGTAGACCG
Reakció paraméterei	
95 °C	2 perc
95 °C ^a	15 másodperc
60 °C ^{a,b}	1 perc

* Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA

** Promega, Madison, WI, USA (ROX-ot tartalmaz)

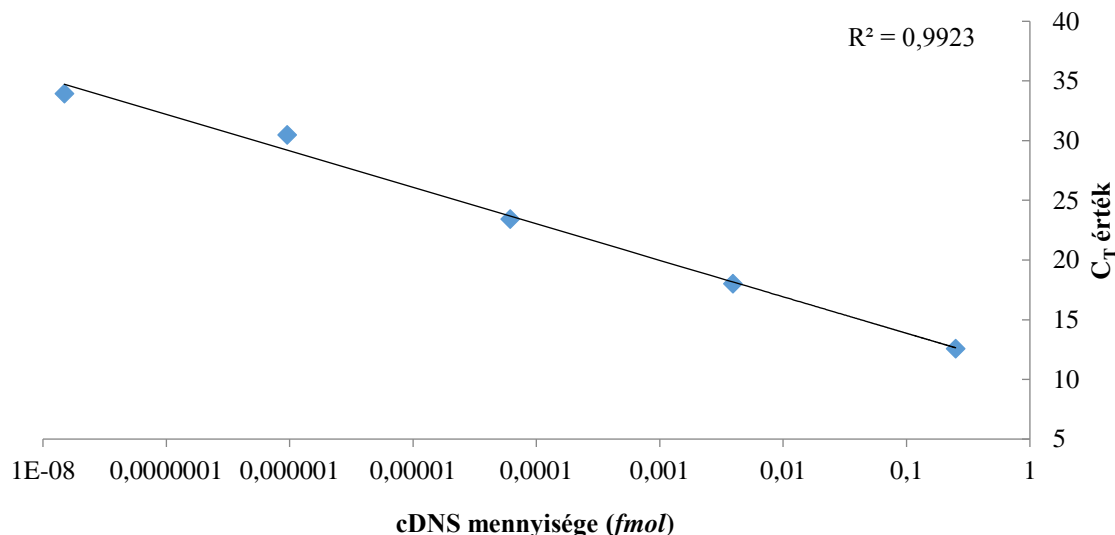
*** A próbát és a primereket az NCBI adatbázis NC_003377.1 referenciaszámú MDMV genomszekvenciára terveztem.

^a A megjelölt lépések 40 cikluson keresztül ismétlődtek.

^b A megjelölt lépésnél mért fluoreszcenciát a műszer

Az abszolút meghatározáshoz egy 500 bázispár hosszúságú referenciaszakaszt használtam, amely az MDMV NCBI adatbázisban levő szakasza alapján készült (IDT, Coralville, IA, USA) és a *CI* gén 3'-végét, valamint a *6K2* gént foglalja magába. A szintetizált szakasz

menyisége 647,7 fmol (200 ng) volt, ezt 100 µl ultratiszta vízben oldottam fel (6,477 fmol/µl), és ebből készítettem 25-szörös hígítást, ami a legtöményebb oldatnak felelt meg (0,259 fmol/µl). Ebből az oldatból 64-szeres hígítást készítettem 4 soron következő hígítási lépés során, melynek eredményeképpen 5-lépéses hígítási sort kaptam. Ezekkel a DNS hígítási oldatokkal real-time PCR reakciót végeztem (a **8. táblázatban** leírtaknak megfelelően), majd a kapott C_T értékeket a megfelelő ismert koncentrációk függvényében ábrázoltam logaritmikus skálán (**3. ábra**).



3. ábra A koncentrációs számoláshoz használt kalibráló egyenes.

A kapott pontokra egyenest illesztettem, majd ennek az egyenesnek az egyenletét használtam fel ($y = -1,327 \ln(x) + 10,808$), hogy ismert C_T értékhez kiszámoljam a megfelelő koncentrációt. Ennek köszönhetően a vírus RNS mennyiségét *attomol/µl* koncentrációban fejeztem ki.

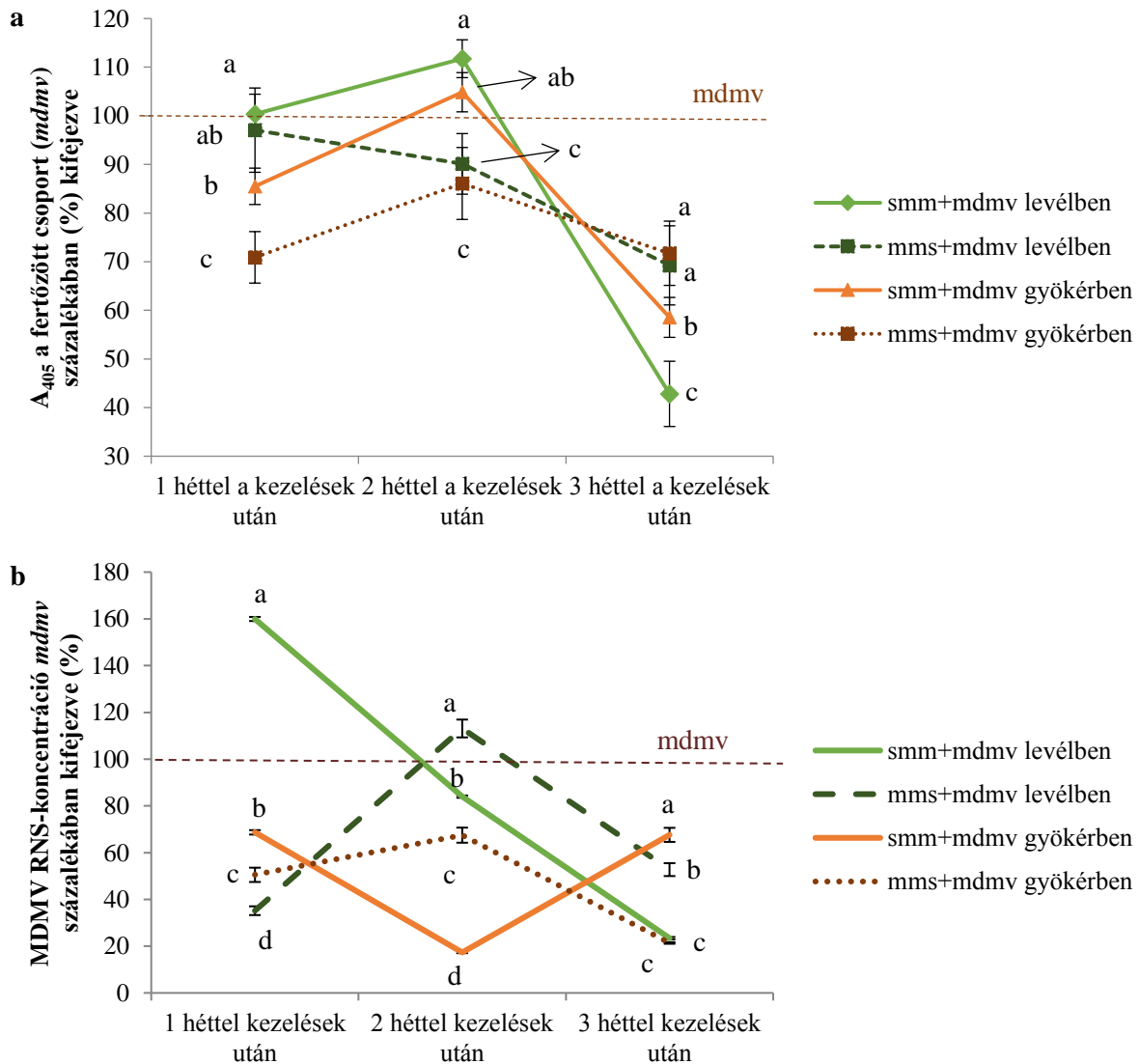
3.12. Statisztikai vizsgálatok

Az adatok kiértékelését Microsoft Office Excel 2016-os programmal végeztem, mely segítségével meghatároztam az adatok szórás értékeit (standard deviation). Az átlagokat ANOVA-val és Tukey-Kramer teszttel vettem össze, hogy megtudjam, hogy szignifikánsak-e a különbségek, 5 %-os szignifikanciaszint mellett (GraphPad InStat statisztikai szoftver). Végül az eredmények közzétételéhez Duncan-féle többszörös összehasonlító tesztjét használtam (Duncan's multiple range test - DMRT), mellyel egyszerű módon lehet feltüntetni a statisztikai különbséget az összes kezelés között.

4. Eredmények

4.1. Az MDMV mennyiségi változásai

Ahhoz, hogy választ kapjak arra a kérdésre, hogy az előkezelések hatására csökken-e a vírus mennyisége, vagy módosul-e az eloszlása a növényen belül, ELISA és qRT-PCR módszerekkel vizsgáltam a virális köpenyfehérje és a vsRNS mennyiségi változásait.



4. ábra MDMV köpenyfehérje (**a**) és RNS (**b**) mennyiségi változásai előkezelt és MDMV-fertőzött kukoricák levelében és gyökerében 1, 2 és 3 héttel a kezelések után. A statisztikai jelölés DMRT alapján készült, ahol a különböző betűk statisztikailag szignifikánsan eltérő eredményeket jelölnek, 5 %-os szignifikanciaszint mellett. A relatív ábrázolás miatt a statisztikai vizsgálatokat heti bontásban végeztem. *mdmv*: MDMV-fertőzött növények csoportja, *smm+mdmv*: SMM-előkezelt fertőzött növények csoportja, *mms+mdmv*: MMS-előkezelt fertőzött növények csoportja.

4.1.1. A vírus mennyiségi változása SMM-előkezelés hatására

1 héttel a kezeléseket követően nem változik a vírus-köpenyfehérje mennyisége a növények levelében (**4a ábra**). Ezzel ellentétesen, az *smm+mdmv* növények levelében a virális RNS mennyisége szignifikánsan meghaladja az *mdmv* növényekben mérhető értéket ($159,9 \pm 0,87$ %) (**4b ábra**). A második héten enyhén nő a köpenyfehérje mennyisége a levelekben az *mdmv*-hez képest ($111,74 \pm 3,89$ %), viszont az RNS mennyisége már csökken ($83,97 \pm 0,49$ %). A harmadik héten az RNS mennyisége tovább csökken az *smm+mdmv* növények levelében ($23,42 \pm 0,49$ %), mellyel összhangban a köpenyfehérje mennyisége is jelentősen esik ($42,82 \pm 6,7$ %).

smm+mdmv növények gyökerében 1 héttel a kezeléseket követően jelentősen csökken a vírus-köpenyfehérje ($85,50 \pm 3,74$ %) és az RNS mennyisége is ($68,69 \pm 0,94$ %). A második héten nő a köpenyfehérje mennyisége ($104,85 \pm 4,04$ %), viszont ezzel ellentétesen drasztikusan csökken az RNS-é ($17,33 \pm 0,32$ %). Noha a harmadik héten nő az RNS mennyisége a második héten mért értékhez képest, még így is szignifikánsan az *mdmv* értéke alatt van ($67,61 \pm 3,01$ %), továbbá a köpenyfehérje mennyisége is jelentősen csökken ezen a héten ($58,55 \pm 4,11$ %).

4.1.2. Az MMS-előkezelés hatása a vírus mennyiségi változásaira

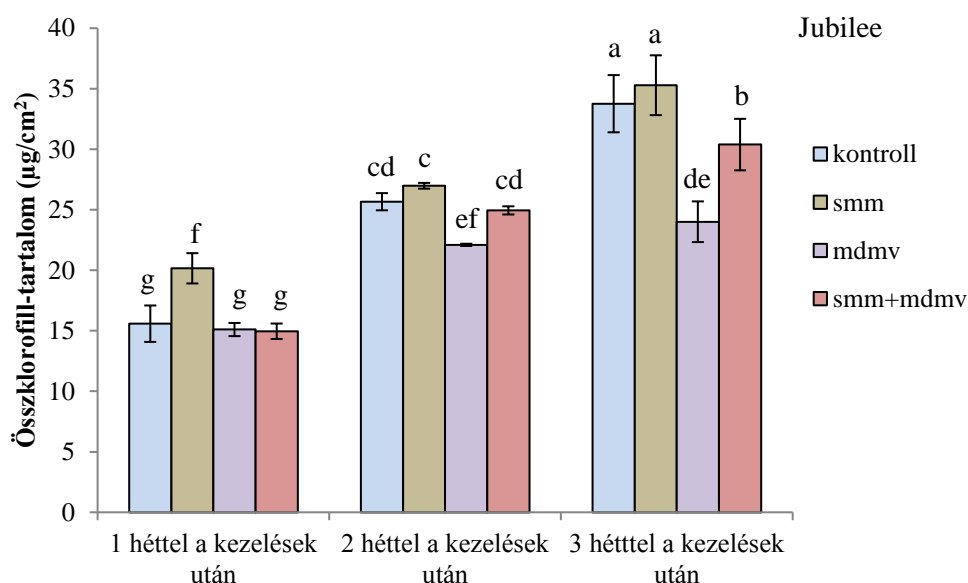
Az *mms+mdmv* növények leveléből mind a három hét alatt jelentősen kevesebb köpenyfehérjét lehet kimutatni, mint az *mdmv* növényekből (1. hét: $97,05 \pm 8,67$ %, 2. hét: $90,12 \pm 6,23$ %, 3. hét: $69,24 \pm 8,14$ %). Ezzel szemben a második héten nő a vírus RNS mennyisége az előkezelt növények levelében ($113,11 \pm 3,82$ %), viszont a harmadik hétre már erősen csökken ($52,74 \pm 2,76$ %).

Az előkezelt növények gyökerében végig szignifikánsan alacsonyabb a köpenyfehérje szintje, mint az *mdmv* növényeknél (1. hét: $70,89 \pm 5,29$ %, 2. hét: $86,09 \pm 7,39$ %, 3. hét: $71,74 \pm 6,61$ %), és ezzel összhangban vírus RNS-ből is végig kevesebb mutatható ki (1. hét: $50,51 \pm 3,05$ %, 2. hét: $67,48 \pm 3,23$ %, 3. hét: $21,36 \pm 0,34$ %).

4.2. A klorofilltartalom változásai

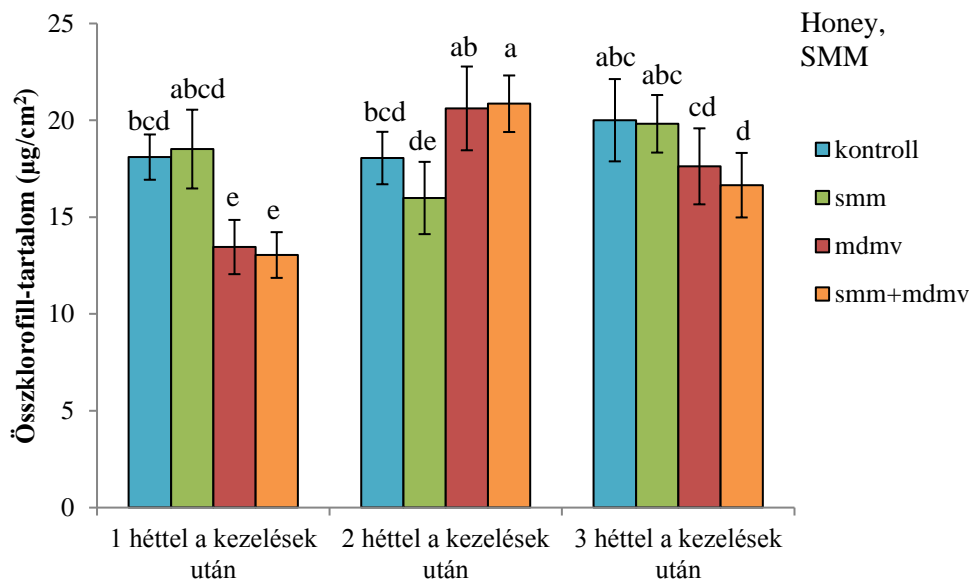
Kutatásom során arra a kérdésre kerestem a választ, hogy a vírusfertőzés hatására tapasztalható-e klorofilltartalom csökkenés, továbbá, hogy az SMM- illetve az MMS-kezelések változtatják-e a klorofilltartalmat? Előkísérleteim során *Zea mays* cv. *saccharata* var. Jubilee Koern. csemegekukorica fajtával dolgoztam. A mérés során összklorofill-tartalmat határoztam

meg, melyet $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ levélfelület egységben fejeztem ki. Az **5. ábra** adatai alapján látható, hogy 2 és 3 héttel a kezelések után csökken az *mdmv* növényekben mérhető klorofilltartalom a *kontroll*hoz képest (2. héten $25,6 \pm 1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a *kontroll* és $22,1 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ az *mdmv*, míg a 3. héten $33,76 \pm 2,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a *kontroll* és $24,0 \pm 2,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ az *mdmv*). Az SMM előkezelésként ellensúlyozza a csökkenést (a 2. héten $24,9 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, míg a 3. héten már $30,4 \pm 2,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ az *smm+mdmv* növények klorofilltartalma), illetve önmagában is emeli a klorofilltartalmat (1. héten $20,2 \pm 1,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ az *smm* növények értéke).

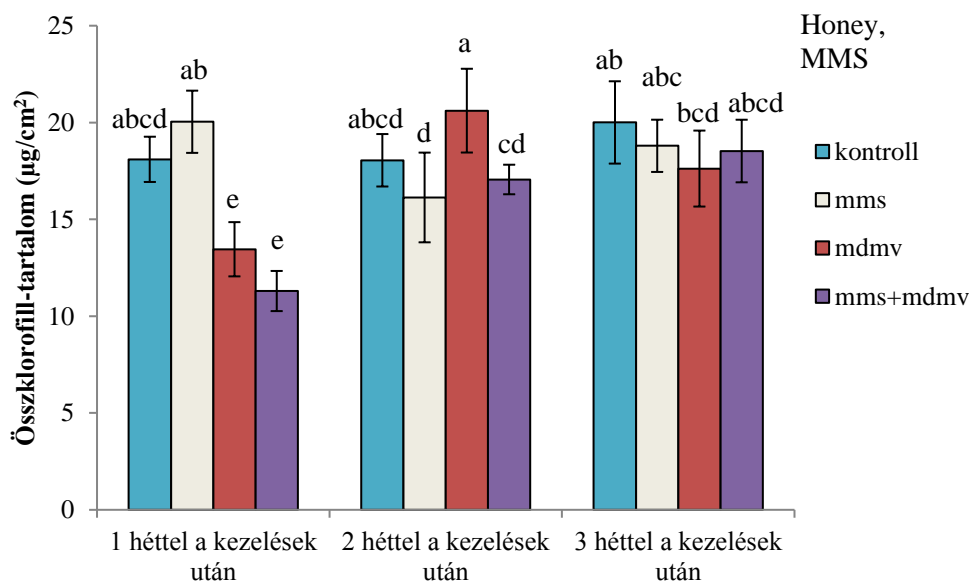


5. ábra *Zea mays* cv. *saccharata* var. Jubilee Koern. csemegekukorica növények összklorofill-tartalom változásai MDMV-fertőzés és SMM-kezelések hatására 1, 2 és 3 héttel a kezelések után mérve. A statisztikai jelölés DMRT alapján készült, ahol a különböző betűk statisztikailag szignifikánsan eltérő eredményeket jelölnek, 5 %-os szignifikanciaszint mellett. *smm*: SMM-kezelt növények csoportja, *mdmv*: MDMV-fertőzött növények csoportja, *smm+mdmv*: SMM-előkezelt fertőzött növények csoportja.

A kísérlet további részében összevetettem a doktori munkám során használt Honey fajtát az előbb bemutatott Jubilee-vel. Az eredményeket az **6. és 7. ábrák** tartalmazzák, előbbinél az SMM-mel, míg utóbbi ábrán az MMS-sel kezelt csoportok vannak feltüntetve. Ennél a kukoricafajtánál már eltérő eredményt kaptam. Noha látszott a fertőzött leveleken a mozaikos mintázat, mégse csökkent szignifikánsan egységnyi levélfelületre vetítve a klorofilltartalom, csak 1 héttel a kezelések után (*mdmv*: $13,5 \pm 1,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). 2 és 3 héttel később a *kontroll* növényektől nem térnek el statisztikailag az *mdmv* növények értékei, és hasonlóan magas klorofilltartalom jellemzi az *smm+mdmv* és *mms+mdmv* csoportokat is.



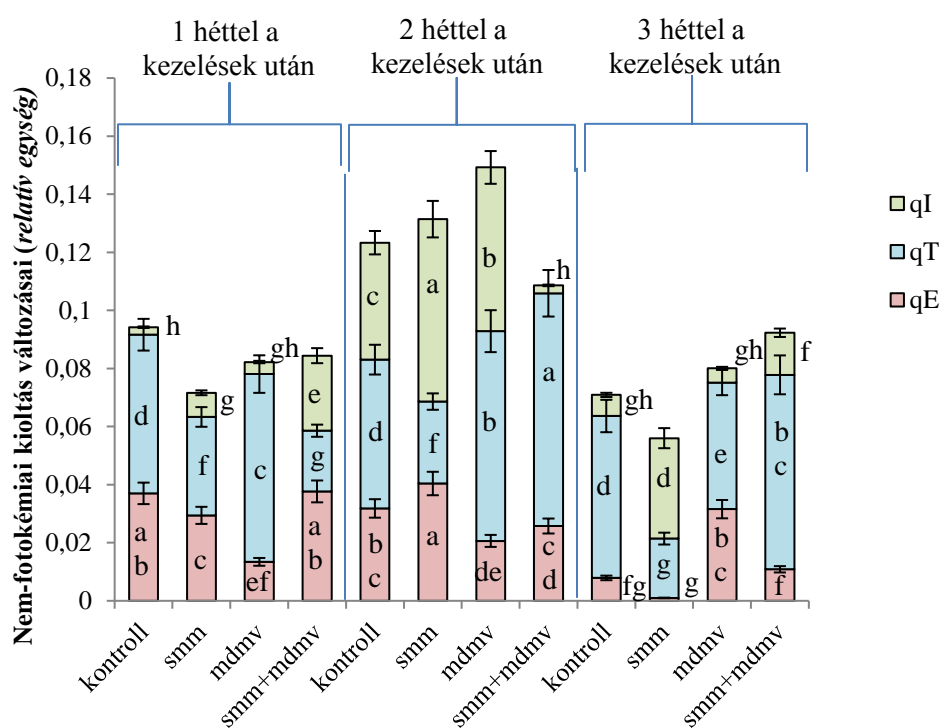
6. ábra *Zea mays* cv. *saccharata* var. Honey Koern. csemegekukorica fajtákon mért összklorofill-tartalom változásai SMM-kezelés hatására 1, 2 és 3 héttel a kezelések után. A statisztikai jelölés DMRT alapján készült, ahol a különböző betűk statisztikailag szignifikánsan eltérő eredményeket jelölnek, 5 %-os szignifikanciaszint mellett. *smm*: SMM-kezelt növények csoportja, *mdmv*: MDMV-fertőzött növények csoportja, *smm+mdmv*: SMM-előkezelt fertőzött növények csoportja.



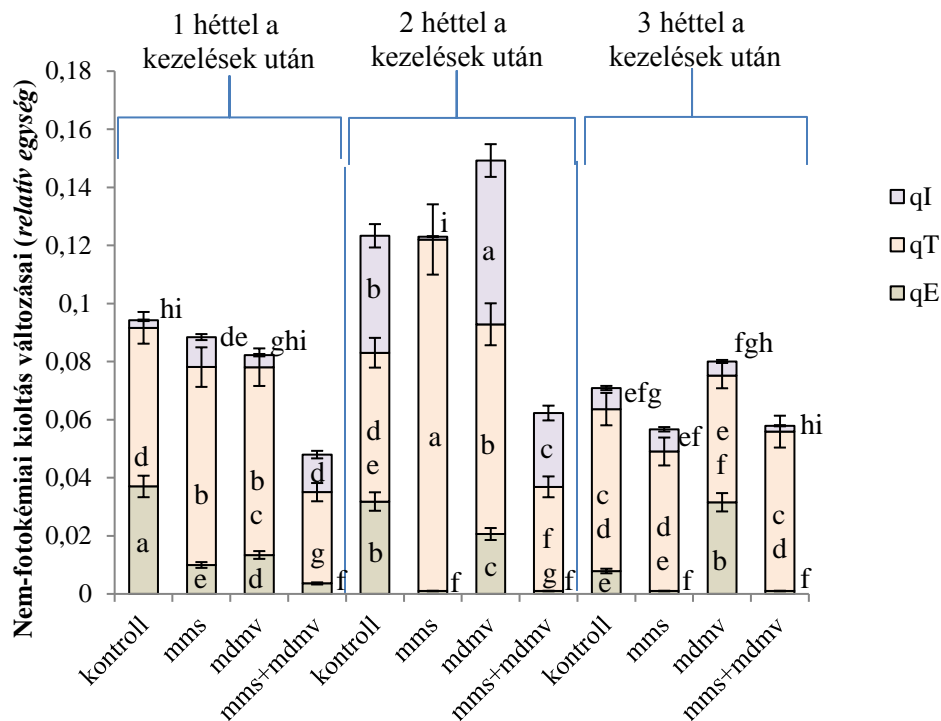
7. ábra *Zea mays* cv. *saccharata* var. Honey Koern. csemegekukorica fajtákon mért összklorofill-tartalom változásai MMS-kezelés hatására 1, 2 és 3 héttel a kezelések után. A statisztikai jelölés DMRT alapján készült, ahol a különböző betűk statisztikailag szignifikánsan eltérő eredményeket jelölnek, 5 %-os szignifikanciaszint mellett. *mms*: MMS-kezelt növények csoportja, *mdmv*: MDMV-fertőzött növények csoportja, *mms+mdmv*: MMS-előkezelt fertőzött növények csoportja.

4.3. A nem-fotokémiai kioltás paramétereinek változásai a kezelések hatására

A klorofilltartalom változásainak feltérképezése mellett a fotoszintetikus rendszer épségét is vizsgáltam. Ehhez a nem-fotokémiai kioltás számos paraméterét mértem Honey csemegekukorica fajtákon. Az értekezésben a két vegyület (SMM és MMS) hatásait először mindig külön fogom tárgyalni, majd minden alfejezet végén összegzem őket. Azért választottam ezt a módot, hogy könnyebben áttekinthető és követhető legyen a vegyületek hatásának az értékelése. Logikai sorrendben először mindig az SMM-mel kezdem a tárgyalást, hiszen időben is azzal a vegyülettel dolgoztam előbb, és utána fogom az MMS-kezelés hatásait ismertetni.



8. ábra A qE , qT és qI paraméterek változásai MDMV-fertőzés és SMM-kezelések hatására 1, 2 és 3 héttel a kezelések után. A statisztikai jelölés DMRT alapján készült, ahol a különböző betűk statisztikailag szignifikánsan eltérő eredményeket jelölnek, 5 %-os szignifikanciaszint mellett. qI : fotoszintézis inhibíciója, qT : state-tranzíció függő kioltás, qE : ΔpH -függő kioltás, *smm*: SMM-kezelt növények csoportja, *mdmv*: MDMV-fertőzött növények csoportja, *smm+mdmv*: SMM-előkezelt fertőzött növények csoportja.



9. ábra A qE, qT és qI paraméterek változásai MDMV-fertőzés és MMS-kezelések hatására 1, 2 és 3 héttel a kezelések után. A statisztikai jelölés DMRT alapján készült, ahol a különböző betűk statisztikailag szignifikánsan eltérő eredményeket jelölnek, 5 %-os szignifikanciaszint mellett. *qI*: fotoszintézis inhibíciója, *qT*: state-tranzíció függő kioltás, *qE*: ΔpH -függő kioltás, *mms*: MMS-kezelt növények csoportja, *mdmv*: MDMV-fertőzött növények csoportja, *mms+mdmv*: MMS-előkezelt fertőzött növények csoportja.

4.3.1. A nem-fotokémiai kioltás változásai fertőzés hatására

Az *mdmv* növényekre az első két hét folyamán alacsonyabb qE jellemző ($0,013 \pm 0,001$ és $0,021 \pm 0,002$), mint a *kontroll* csoportra ($0,037 \pm 0,004$ és $0,032 \pm 0,003$), azonban 3 héttel a kezelések után megfordul ez a tendencia, és az *mdmv* növények rendelkeznek a legmagasabb qE értékkel ($0,031 \pm 0,003$) (8. és 9. ábra). A csökkent qE paraméter emelkedett qT értékkel párosul az első és második hét során (1. héten $0,064 \pm 0,005$ az *mdmv* értéke, míg a második héten $0,072 \pm 0,006$), majd ezzel összhangban a harmadik héten a qE-vel fordítottan arányosan a qT értéke csökken ($0,043 \pm 0,003$). A qI értékében nem látható jelentős változás az *mdmv* növényeknél: az első és a harmadik héten nem tér el az érték szignifikánsan a *kontroll* növényekétől, míg a második héten némileg felettük van ($0,04 \pm 0,003$ a *kontroll*, míg $0,056 \pm 0,005$ az *mdmv*).

4.3.2. Az SMM-kezelés hatásai a nem-fotokémiai kioltásra

Az SMM-kezelés jelentős változást okoz a nem-fotokémiai kioltás paramétereinek változásában (**8. ábra**). Az első héten a qE értéke szignifikánsan a *kontroll* értéke alatt van ($0,029 \pm 0,002$ az *smm*, míg $0,037 \pm 0,003$ a *kontroll*), viszont meghaladja az *mdmv* növényekben mérhető értéket ($0,013 \pm 0,001$). A második héten pont fordítva, az *smm* csoport értéke statisztikailag meghaladja a *kontroll* értékét, itt mérhető a legmagasabb qE érték a teljes kísérlet alatt ($0,04 \pm 0,004$). A harmadik héten a *kontroll*nál alacsonyabb a qE ($0,008 \pm 0,001$). A qT mindig szignifikánsan alacsonyabb az *smm* csoportban, mint a *kontroll* növényeknél, jelentősen elmaradva az *mdmv* növények értékétől is. A qI értéke viszont a második és a harmadik héten jelentős növekedést mutat, a második héten az *smm* csoportoknál mérhető a legmagasabb érték az egész kísérlet során ($0,062 \pm 0,005$ a második héten).

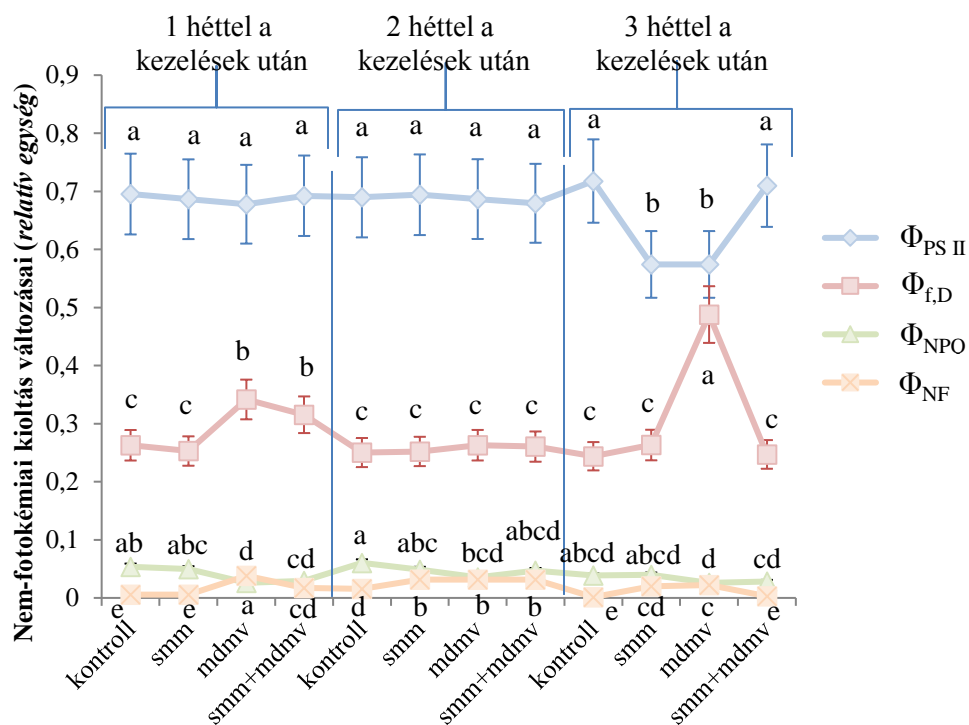
4.3.3. Az MMS-kezelés hatásai a nem-fotokémiai kioltásra

Az MMS-kezelés hatására mind a 3 hét során jelentősen csökken a qE értéke a növények levelében ($0,009 \pm 0,001$, $0,001 \pm 0,0002$ és $0,001 \pm 0,0002$), szignifikánsan elmaradva a *kontroll* ($0,037 \pm 0,003$, $0,032 \pm 0,003$ és $0,008 \pm 0,0009$) és az *mdmv* növények értékeitől (**9. ábra**). Ezzel ellentétesen, a második hét során az *mms* növényeknél mérhető a legmagasabb qT érték ($0,121 \pm 0,05$), statisztikailag eltérve az összes többi kezelés értékétől. Az első héten is magas a csoportban mérhető qT érték ($0,068 \pm 0,005$), viszont statisztikailag nem különbözik az *mdmv* értékétől ($0,064 \pm 0,005$), a harmadik héten pedig már egyik kezeléstől se tér el szignifikánsan. Az első héten az *mms* növényeknél magas a qI érték ($0,01 \pm 0,001$), viszont a második hétre jelentősen csökken ($0,001 \pm 0,0009$), elmaradva a többi kezelés értékétől. A harmadik héten a qI értéke már nem tér el szignifikánsan a *kontroll* és az *mdmv* növények értékétől.

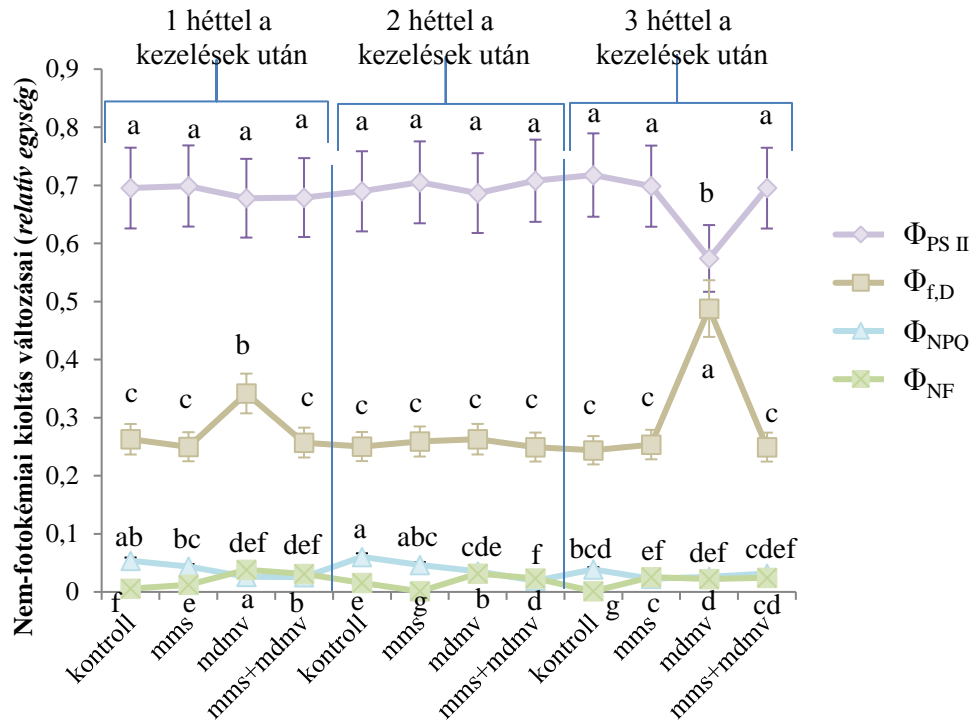
4.3.4. Változások a fertőzött növények nem-fotokémiai kioltásában SMM- és MMS-előkezelések hatására

Az *smm+mdmv* növények értékei is jelentős változásokat mutatnak a többi kezelési csoporthoz képest (**8. ábra**). 1 héttel a kezeléseket után az *smm+mdmv* növényekben magasabb a qE értéke ($0,038 \pm 0,004$), mint az *mdmv*-nél ($0,013 \pm 0,001$). A többi hét során folyamatosan csökken az *smm+mdmv* növények qE értéke, és a harmadik héten már szignifikánsan elmarad az *mdmv* növények értékétől ($0,011 \pm 0,001$ az *smm+mdmv*, míg $0,032 \pm 0,003$ az *mdmv*). Ugyan a qE érték egyik hét során sem tér el szignifikánsan a *kontroll* növény értékétől, a qT-ről ez már nem mondható el. A qT az első héten az *smm+mdmv*-nél mutatja a legalacsonyabb értéket ($0,021 \pm 0,002$), jelentősen elmaradva az *mdmv* növényekben mérhető értéktől ($0,065 \pm 0,006$). A második és a harmadik hét során ennél a csoportnál mérhetők a legmagasabb értékek ($0,08 \pm 0,008$ és $0,067 \pm 0,007$), melyek jelentősen meghaladják az *mdmv* növények értékét is ($0,072 \pm 0,007$ és $0,044 \pm 0,004$). Amíg a qI értéke az első héten szignifikánsan meghaladja a többi csoportnál mérhető értékeket ($0,026 \pm 0,003$), addig a második héten már jelentősen elmarad tőlük. A harmadik héten némileg, bár statisztikailag a *kontroll* és az *mdmv* növények értéke felett van ($0,014 \pm 0,001$ az *smm+mdmv* értéke).

Az MMS-előkezelés jelentős változásokat okozott a fertőzött növényekben (**9. ábra**). A qE értéke minden hét során alacsonyan marad ($0,004 \pm 0,0004$, $0,001 \pm 0,0001$ és $0,001 \pm 0,0001$), statisztikailag elkülönülve az *mdmv* növények értékétől ($0,013 \pm 0,001$, $0,021 \pm 0,002$ és $0,032 \pm 0,003$). Az első és a második hét során a qT értéke szignifikánsan alacsonyabb az *mdmv*-hez képest ($0,031 \pm 0,003$ és $0,036 \pm 0,004$ az *mms+mdmv*, és $0,065 \pm 0,007$ és $0,072 \pm 0,007$ az *mdmv*), mely tendencia megfordul a harmadik héten, és az *mms+mdmv* növények értékei ($0,055 \pm 0,006$) meghaladják az *mdmv*-t is ($0,044 \pm 0,004$). Az első héten az *mms+mdmv* növények qI értéke jelentősen meghaladja a többi kezelési csoport értékét ($0,013 \pm 0,001$). A második héten a qI értéke már jelentősen elmarad az *mdmv* növényeknél mérhető értéktől ($0,025 \pm 0,003$ az *mms+mdmv* és $0,056 \pm 0,006$ az *mdmv*), és a harmadik héten is alacsonyan marad az *mms+mdmv* csoportoknál ($0,002 \pm 0,0002$).



10. ábra A $\Phi_{PS II}$, $\Phi_{f,D}$, Φ_{NPQ} és a Φ_{NF} paraméterek változásai MDMV-fertőzés és SMM-kezelések hatására 1, 2 és 3 héttel a kezelések után. A statisztikai jelölés DMRT alapján készült, ahol a különböző betűk statisztikailag szignifikánsan eltérő eredményeket jelölnek, 5 %-os szignifikanciaszint mellett. $\Phi_{PS II}$: aktív PS II reakciócentrumok hatékonysága, $\Phi_{f,D}$: fluoreszcencia alapú- és konstitutív hődisszipáció, Φ_{NPQ} : ΔpH - és xantofill ciklus-alapú kioltás, Φ_{NF} : inaktiválódott PS II reakciócentrumok hődisszipációja, *smm*: SMM-kezelt növények csoportja, *mdmv*: MDMV-fertőzött növények csoportja, *smm+mdmv*: SMM-előkezelt fertőzött növények csoportja.



11. ábra A $\Phi_{PS II}$, $\Phi_{f,D}$, Φ_{NPQ} és a Φ_{NF} paraméterek változásai MDMV-fertőzés és MMS-kezelések hatására 1, 2 és 3 héttel a kezelések után. A statisztikai jelölés DMRT alapján készült, ahol a különböző betűk statisztikailag szignifikánsan eltérő eredményeket jelölnek, 5 %-os szignifikanciaszint mellett. $\Phi_{PS II}$: aktív PS II reakciócentrumok hatékonysága, $\Phi_{f,D}$: fluoreszcencia alapú- és konstitutív hődisszipáció, Φ_{NPQ} : ΔpH - és xantofill ciklus-alapú kioltás, Φ_{NF} : inaktiválódott PS II reakciócentrumok hődisszipációja, *mms*: MMS-kezelt növények csoportja, *mdmv*: MDMV-fertőzött növények csoportja, *mms+mdmv*: MMS-előkezelte fertőzött növények csoportja.

4.3.5. Az MDMV-fertőzés hatásai a Φ -paraméterek változásaira

A nem-fotokémiai kioltás paramétereiben tapasztalható legnagyobb változásokat az *mdmv* növényeknél mértem (10. és 11. ábra). A kísérlet harmadik hetében ennél a csoportnál volt a legalacsonyabb (az *smm* mellett) a $\Phi_{PS II}$ értéke ($0,574 \pm 0,06$). Ezzel ellentétesen változott a $\Phi_{f,D}$, mely szignifikánsan emelkedett a fertőzés hatására az első és a harmadik hét során ($0,341 \pm 0,03$ és $0,488 \pm 0,05$). Csekély csökkenés volt tapasztalható a Φ_{NPQ} értékében (1. héten $0,026 \pm 0,003$, 2. héten $0,035 \pm 0,004$), míg a Φ_{NF} enyhén növekedett a fertőzés hatására ($0,038 \pm 0,004$, $0,032 \pm 0,003$ és $0,022 \pm 0,002$ az első, második és harmadik hét során).

4.3.6. A nem-fotokémiai kioltás Φ -paramétereinek változásai az SMM-kezelés hatására

Az SMM-kezelés nem okozott jelentős változásokat a nem-fotokémiai kioltás paramétereiben (**10. ábra**). A $\Phi_{PS II}$ értéke a harmadik héten tér el a *kontroll*tól, statisztikailag elmarad tőle ($0,574 \pm 0,06$ az *smm*, míg $0,718 \pm 0,07$ a *kontroll*). A $\Phi_{f,D}$ értéke végig megegyezik a *kontroll*ével, hasonlóan a Φ_{NPQ} -hoz. Különbség a Φ_{NF} értékében mutatkozott a második és a harmadik hét folyamán, ahol az *smm* növények értékei ($0,032 \pm 0,003$ és $0,02 \pm 0,002$) statisztikailag meghaladták a *kontroll* ($0,016 \pm 0,002$ és $0,001 \pm 0,0001$) növényekét.

4.3.7. Az MMS-kezelés hatásai a Φ -értékekre

Az MMS-kezelés hatására egyik héten sem tapasztalható változás a $\Phi_{PS II}$ és a $\Phi_{f,D}$ értékében (**11. ábra**). A harmadik hétre csökken a Φ_{NPQ} értéke a *kontroll*hoz képest (*mms*: $0,022 \pm 0,002$, *kontroll*: $0,039 \pm 0,004$). Ezzel ellentétesen változik a Φ_{NF} értéke, mely minden héten statisztikailag eltér a *kontroll* növények értékétől. A második héten az MMS-kezelés hatására csökken (*mms*: $0,001 \pm 0,0001$, *kontroll*: $0,016 \pm 0,002$), míg az első és a harmadik héten jelentősen nő a paraméter értéke a *kontroll* növényekhez képest (*mms*: $0,012 \pm 0,001$ és $0,025 \pm 0,003$, *kontroll*: $0,006 \pm 0,0006$ és $0,001 \pm 0,0001$).

4.3.8. Változások a Φ -értékekben SMM- és MMS-előkezelések hatására fertőzött növényeknél

Mind az SMM-, mind az MMS-előkezelések jelentősen módosították a nem-fotokémiai kioltás értékeit (**10. és 11. ábra**). A kezelés harmadik hetében tapasztalt drasztikus csökkenés az *mdmv* növények $\Phi_{PS II}$ értékében nem volt megfigyelhető egyik előkezelt fertőzött növénynél sem. Hasonlóan, szintén a harmadik héten mért emelkedés a $\Phi_{f,D}$ paraméternél se volt megfigyelhető az előkezelések hatására. *mms+mdmv* növényeknél a második hét folyamán csökkent a Φ_{NPQ} értéke ($0,02 \pm 0,002$) az *mdmv* növényekhez képest ($0,035 \pm 0,004$), viszont a többi mérési időben, illetve *smm+mdmv* növényeknél nem volt változás. *smm+mdmv*-nél az 1. és 3. héten ($0,017 \pm 0,002$ és $0,003 \pm 0,0003$), míg *mms+mdmv*-nél az 1. és 2. héten ($0,031 \pm 0,003$ és $0,024 \pm 0,002$) csökkent a Φ_{NF} értéke az *mdmv* növényekhez képest ($0,038 \pm 0,004$, $0,032 \pm 0,003$ és $0,022 \pm 0,002$ az 1., 2. és 3. hét során).

4.4. A fenoloidtartalom változásai fertőzött és a vegyületekkel előkezelt növényekben

Közismert, hogy vírusfertőzést követően aktiválódik a növényi védekezőrendszer, viszont a növényi anyagcserére gyakorolt hatásáról kevés információ áll még a rendelkezésünkre. Hogy pontosabb képet kapjak az anyagcserét érintő változásokról, megvizsgáltam a fenoloidtartalom változásait is. Először a különböző hullámhosszon fluoreszkáló vegyületek mennyiségi és minőségi változásait vizsgáltam SMM-kezelés hatására. Ezt követően fotometriásan összfenoloid-tartalmat határoztam meg, majd qRT-PCR technikával a fenilpropanoid bioszintézis útvonal két enzimének, a *C4H*-nak és a *CHS*-nek vizsgáltam a génexpressziós változásait. Az utóbbi méréseknél az SMM mellett az MMS-kezelés hatásait is mértem.

4.4.1. A fluoreszcencia-leképezés során 440 és 520 nm-en mért emisszióváltozás eredményei

9. táblázat A 440 és 520 nm-en mért fluoreszcenciahozamok változásai SMM-kezelt és MDMV-fertőzött növényeknél

Kezelések		Fluoreszcenciaemissziók	
		440 nm	520 nm
1 héttel a kezelések után	<i>kontroll</i>	106,2 ± 10,9 ^g	109,4 ± 12,0 ^f
	<i>smm</i>	108,2 ± 1,7 ^g	134,0 ± 10,3 ^{ef}
	<i>mdmv</i>	60,2 ± 6,5 ^h	108,6 ± 9,8 ^f
	<i>smm+mdmv</i>	75,7 ± 8,8 ^{gh}	174,1 ± 13,8 ^e
2 héttel a kezelések után	<i>kontroll</i>	349,6 ± 10,6 ^d	380,4 ± 17,6 ^c
	<i>smm</i>	510,8 ± 28,5 ^b	467,4 ± 73,7 ^b
	<i>mdmv</i>	306,4 ± 35,8 ^d	703,1 ± 30,9 ^a
	<i>smm+mdmv</i>	574,8 ± 29,4 ^a	480,7 ± 13,3 ^b
3 héttel a kezelések után	<i>kontroll</i>	182,8 ± 18,0 ^f	291,5 ± 30,8 ^d
	<i>smm</i>	256,1 ± 39,4 ^e	442,7 ± 60,1 ^b
	<i>mdmv</i>	227,4 ± 25,9 ^{ef}	310,3 ± 32,9 ^d
	<i>smm+mdmv</i>	411,1 ± 37,5 ^c	384,6 ± 21,3 ^c

4.4.1.1. A fertőzés hatásai a 440 és 520 nm-es fluoreszcenciaemissziók változására

A fertőzést követő első héten jelentősen csökkent a 440 nm-es fluoreszcencia a *kontroll*hoz képest (*mdmv*: 60,2 ± 6,5, *kontroll*: 106,2 ± 10,9), azonban a többi hét folyamán már statisztikailag nem tér el tőle (**9. táblázat**). Ezzel szemben az 520 nm-es fluoreszcencia szignifikánsan megnő a második héten az *mdmv* növényeknél (703,1 ± 30,9), meghaladva a többi kezelési csoport értékeit is. Az első és a harmadik héten az 520 nm-es fluoreszcenciaérték nem tér el a *kontroll*nál mért értékektől.

4.4.1.2. Az SMM-kezelés hatásai a fluoreszcenciahozamok változására

Az SMM-kezelés hatására jelentősen nőtt a 440 nm-es fluoreszcencia a *kontroll*hoz képest a második és harmadik hét folyamán (*smm*: $510,8 \pm 28,5$ és $256,1 \pm 39,4$, *kontroll*: $349,6 \pm 10,6$ és $182,8 \pm 18$, **9. táblázat**). Hasonló növekedés az 520 nm-es fluoreszcenciánál is mérhető, szintén a második és a harmadik héten (*smm*: $467,4 \pm 73,7$ és $442,7 \pm 60,1$, *kontroll*: $380,4 \pm 17,6$ és $291,5 \pm 30,8$).

4.4.1.3. Az SMM-előkezelés hatása fertőzött növényeknél a 440 és 520 nm-es fluoreszcenciaértékekre

Az előkezelés hatására jelentősen nő a 440 nm-es fluoreszcencia két ($574,8 \pm 29,4$) és három héttel ($411,1 \pm 37,5$) a kezelések után az *mdmv* növényekhez képest ($306,4 \pm 35,8$ és $227,4 \pm 25,9$, **9. táblázat**). Ezzel szembeállítva az 520 nm-es fluoreszcenciaérték változása összetettebb, ugyanis amíg a második héten az *smm+mdmv* növényeknél jóval alacsonyabb a fluoreszcencia ($480,7 \pm 13,3$), mint az *mdmv*-nél ($703,1 \pm 30,9$), addig az első és a harmadik héten már szignifikánsan meghaladja azt (1. hét *smm+mdmv*: $174,1 \pm 13,8$, 3. hét: $384,6 \pm 21,3$, *mdmv* 1. hét: $108,6 \pm 9,8$ és $310,3 \pm 32,9$).

4.4.2. A fotometriás méréssel meghatározott összfenoloid-tartalom és változásai

A fluoreszcenciahozamok mellett fotometriásan is vizsgáltam, hogy a növényi védelemben is szerepet játszó fenoloidszármazékoknak hogyan változik a mennyisége az előkezelések hatására.

4.4.2.1. A fertőzés hatása az összfenoloid-tartalom változásaira

mdmv növények levelében egyedül az első héten tapasztalható szignifikáns növekedés ($58,1 \pm 0,66 \mu\text{M}$ galluszsav ekvivalens) a *kontroll*hoz képest ($52,2 \pm 2,13 \mu\text{M}$ galluszsav ekvivalens), a többi hét során már nem tér el jelentősen tőle (**12a és b ábrák**). Ezzel szemben az *mdmv* növények szárában egy és két héttel a kezelések után is szignifikánsan magasabb az összfenoloid-tartalom ($72,0 \pm 7,26 \mu\text{M}$ galluszsav ekvivalens az első és $57,8 \pm 0,53$ a második héten) a *kontroll*hoz képest ($62,0 \pm 5,02$ és $28,5 \pm 3,20 \mu\text{M}$ galluszsav ekvivalens) (**12c és d ábrák**).

4.4.2.2. Az SMM-kezelés hatásai az összfenoloid-tartalomra

Az *smm* növények levelében csekély csökkenés mérhető az összfenoloid-tartalomban két héttel a kezelések után a *kontroll*hoz képest (*smm*: $52,8 \pm 8,84$, *kontroll*: $58,2 \pm 2,33$), míg a többi héten nem tér el tőle (**12a ábra**). Az SMM-kezelés nem okozott változást a növények szárában.

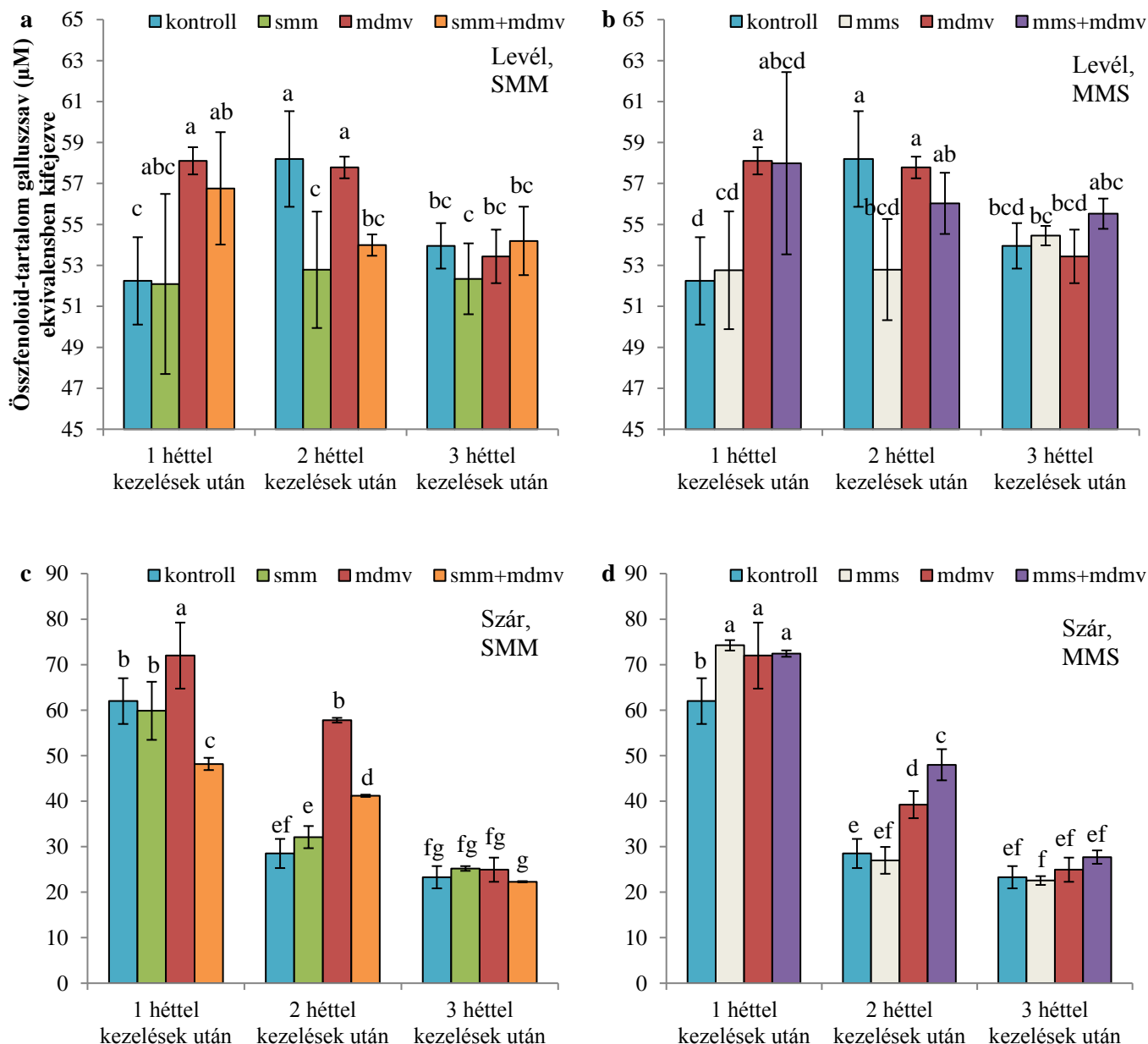
4.4.2.3. Az MMS-kezelés hatásai az összfenoloid-tartalomra

Az *mms* növények levelében, az SMM-kezeltékhez hasonlóan szintén a második héten tapasztalható szignifikáns csökkenés az összfenoloid-tartalomban ($52,8 \pm 2,47$) (**12b ábra**). Ezzel szemben az *mms* növények szárában szignifikáns növekedés mérhető a *kontroll*hoz képest az első héten (*mms*: $74,2 \pm 1,14$, *kontroll*: $62,0 \pm 5,03$) (**12d ábra**).

4.4.2.4. Az SMM- és MMS-előkezelések hatásai az összfenoloid-tartalomra fertőzött növényeknél

Az SMM-előkezelés a második héten csökkenti a fertőzött növények levelében az összfenoloid-tartalmat az *mdmv* növényekhez képest (*smm+mdmv*: $54,0 \pm 0,52$, *mdmv*: $57,8 \pm 0,53$) (**12a ábra**). *smm+mdmv* növényeknél 1 és 2 héttel a kezelések után jelentősen csökken az összfenoloidok mennyisége a növények szárában ($48,2 \pm 1,35$ és $41,2 \pm 0,24$) (**12c ábra**). Ezzel

ellentétesen az *mms+mdmv* növényeknél a második héten növekedés tapasztalható a növények ($48,0 \pm 3,42$) szárában az *mdmv*-hez képest ($39,2 \pm 2,97$) (12d ábra).



12. ábra Az összfenoloid-tartalom változásai galluszsav-ekvivalensben kifejezve 1, 2 és 3 héttel a kezelések után. Az **a** és **b** ábrán a különböző kezelések hatásait ábrázoltam a növények levelében mérve, míg a **c** és **d** ábrákon ugyanezen növények szárában mért értékek szerepelnek. A statisztikai jelölés DMRT alapján készült, ahol a különböző betűk statisztikailag szignifikánsan eltérő eredményeket jelölnek, 5 %-os szignifikanciaszint mellett. *smm*: SMM-kezelt növények csoportja, *mms*: MMS-kezelt növények csoportja, *mdmv*: MDMV-fertőzött növények csoportja, *smm+mdmv*: SMM-előkezelt fertőzött növények csoportja, *mms+mdmv*: MMS-előkezelt fertőzött növények csoportja.

4.4.3. A fenilpropanoid bioszintézis útvonal vizsgálata

A fenilpropanoid bioszintézis útvonal számos védő hatású vegyület szintéziséhez járul hozzá, így vizsgálatával részletes kép kapható a kezelések anyagcserét befolyásoló hatásáról.

4.4.3.1. MDMV-fertőzés hatása a *C4H* gén expressziójára

Egy héttel a fertőzést követően jelentősen nő a növények levelében a *C4H* génexpressziója ($3,49 \pm 0,03$) (**13a és b ábrák**). A következő hetekben csökkenés figyelhető meg, két héttel a kezelések után már szignifikánsan a *kontroll* növények szintje alatt van a génexpresszió (*mdmv*: $0,33 \pm 0,01$). A növények szárában egy és három héttel a kezelések után is a *kontroll* növényekben mért érték alatt marad a génexpresszió (1. hét *mdmv*: $0,17 \pm 0,01$, 3. hét: $0,41 \pm 0,01$), viszont a második héten statisztikailag megegyezik vele (**13c és d ábrák**).

4.4.3.2. Az SMM-kezelés hatása a *C4H* gén expressziójára

SMM-kezelés hatására jelentősen csökken a növények levelében a *C4H* génexpressziója a *kontroll*hoz képest (1. hét: $0,46 \pm 0,01$, 2. hét: $0,76 \pm 0,01$, 3. hét: $0,09 \pm 0,01$) (**13a ábra**). A kukoricák szárában némileg módosul az előkezelés hatására a gén expressziója: 1 héttel a kezelések után nő ($1,31 \pm 0,03$), viszont a második és a harmadik héten már szignifikánsan alacsonyabb a *kontroll*nál (2. hét: $0,28 \pm 0,01$, 3. hét: $0,12 \pm 0,01$) (**13c ábra**).

4.4.3.3. Az MMS-kezelés hatása a *C4H* gén expressziójára

A kezelés hatására jelentősen csökken a gén expressziója a növények levelében (1. hét: $0,28 \pm 0,01$, 2. hét: $0,04 \pm 0,01$, 3. hét: $0,03 \pm 0,01$) (**13b ábra**). A növények szárában hasonló eredményt kaptam, mint az *smm* növényeknél, nevezetesen, egy héttel a kezelések után szignifikánsan nő a gén kifejeződése ($1,44 \pm 0,02$), viszont a második és a harmadik héten már alacsony szinten van (2. hét: $0,2 \pm 0,01$, 3. hét: $0,09 \pm 0,01$) (**13d ábra**).

4.4.3.4. Az SMM- és MMS-előkezelések hatása a *C4H* gén expressziójára vírusfertőzött növényekben

Az SMM-előkezelés fertőzés során jelentős növekedést okoz a *C4H* génexpressziójában levélben és szárban egyaránt. Levelekben mérve már a második héten tapasztalható szignifikáns növekedés ($9,72 \pm 0,12$), mely csökken a harmadik hétre ($4,13 \pm 0,02$), viszont még így is

szignifikánsan a *kontroll* és a többi kezelési csoport értéke felett van (**13a ábra**). A növények szárában a harmadik héten tapasztalható hasonló növekedés az *smm+mdmv* növényekben, mellyel jelentősen meghaladja a többi kezelési csoport értékét ($3,43 \pm 0,01$) (**13c ábra**).

Hasonlóan az SMM-előkezeléshez, az *mms+mdmv* növényekben is jelentősen nő a gén expressziója. A génexpresszió maximuma egy és három héttel a kezeléseket után mérhető levélben ($3,5 \pm 0,01$), továbbá három héttel a kezeléseket után szárbán ($3,25 \pm 0,01$, **13b és d ábrák**).

4.4.3.5. A fertőzés hatása a *CHS* gén expressziójára

mdmv növények levelében jelentősen csökken a gén expressziója (1. hét: $0,78 \pm 0,01$, 2. hét: $0,11 \pm 0,01$, 3. hét: $0,1 \pm 0,01$). Ettől eltérően, *mdmv* növények szárában egy héttel a kezeléseket után csekély mértékben, de szignifikánsan magasabb a *CHS* génexpressziója a *kontroll*hoz képest ($1,15 \pm 0,02$) (**14. ábra**).

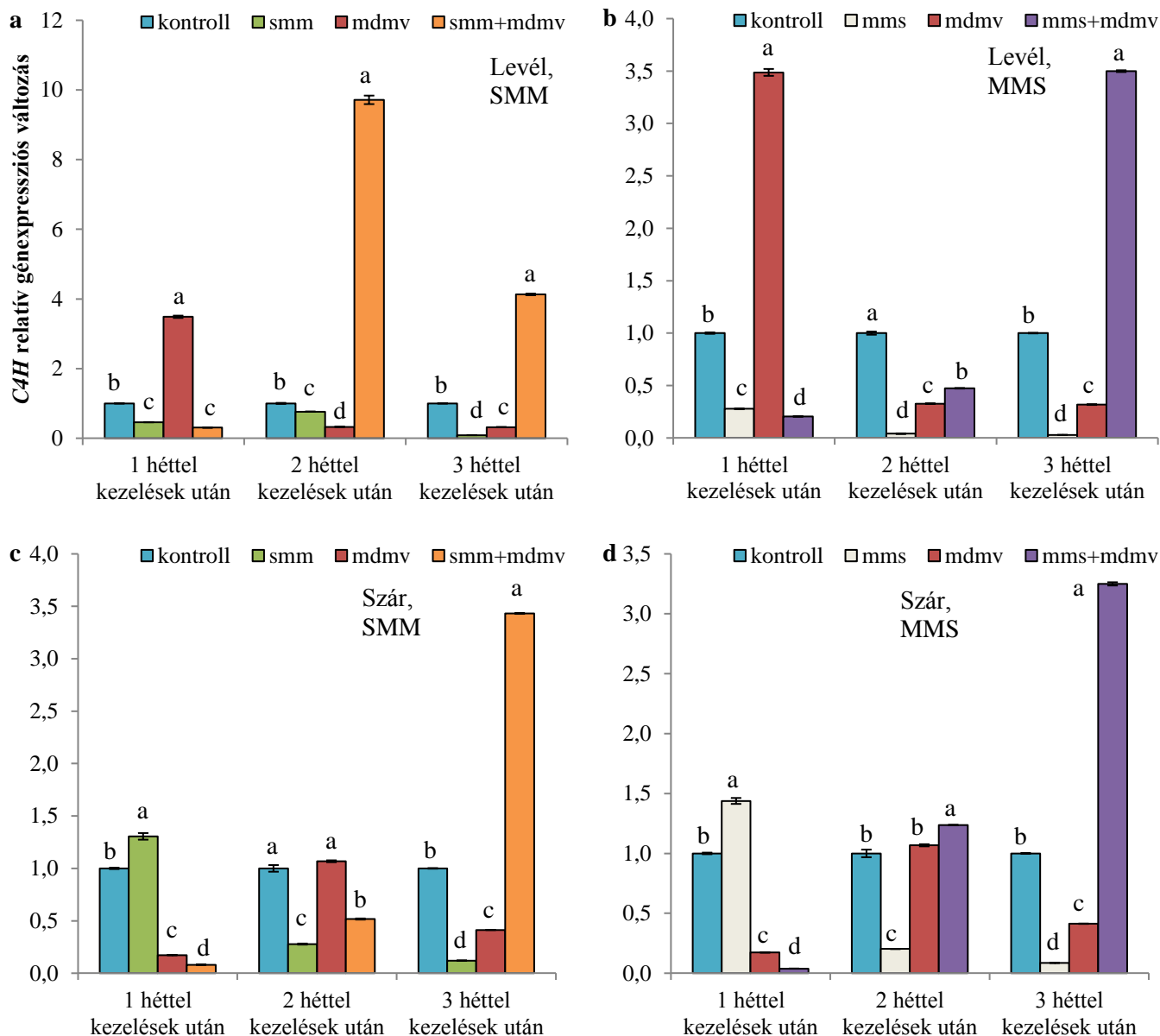
4.4.3.6. Az SMM- és MMS-kezelés hatása a *CHS* gén expressziójára

Az SMM-kezelés szignifikánsan csökkenti a *CHS* génexpresszióját levélben és szárbán egyaránt (levélben 1. hét: $0,13 \pm 0,01$, 2. hét: $0,8 \pm 0,01$, 3. hét: $0,07 \pm 0,01$, szárbán 1. hét: $0,38 \pm 0,01$, 2. hét: $0,06 \pm 0,01$, 3. hét: $0,55 \pm 0,01$) (**14a és c ábrák**). Az MMS-kezelés az első héten növeli a gén expresszióját levélben ($1,41 \pm 0,01$) és szárbán ($1,4 \pm 0,01$) egyaránt. Két és három héttel a kezeléseket után azonban az *smm* növényeknél is megfigyelt alacsony érték mérhető (**14b és d ábrák**).

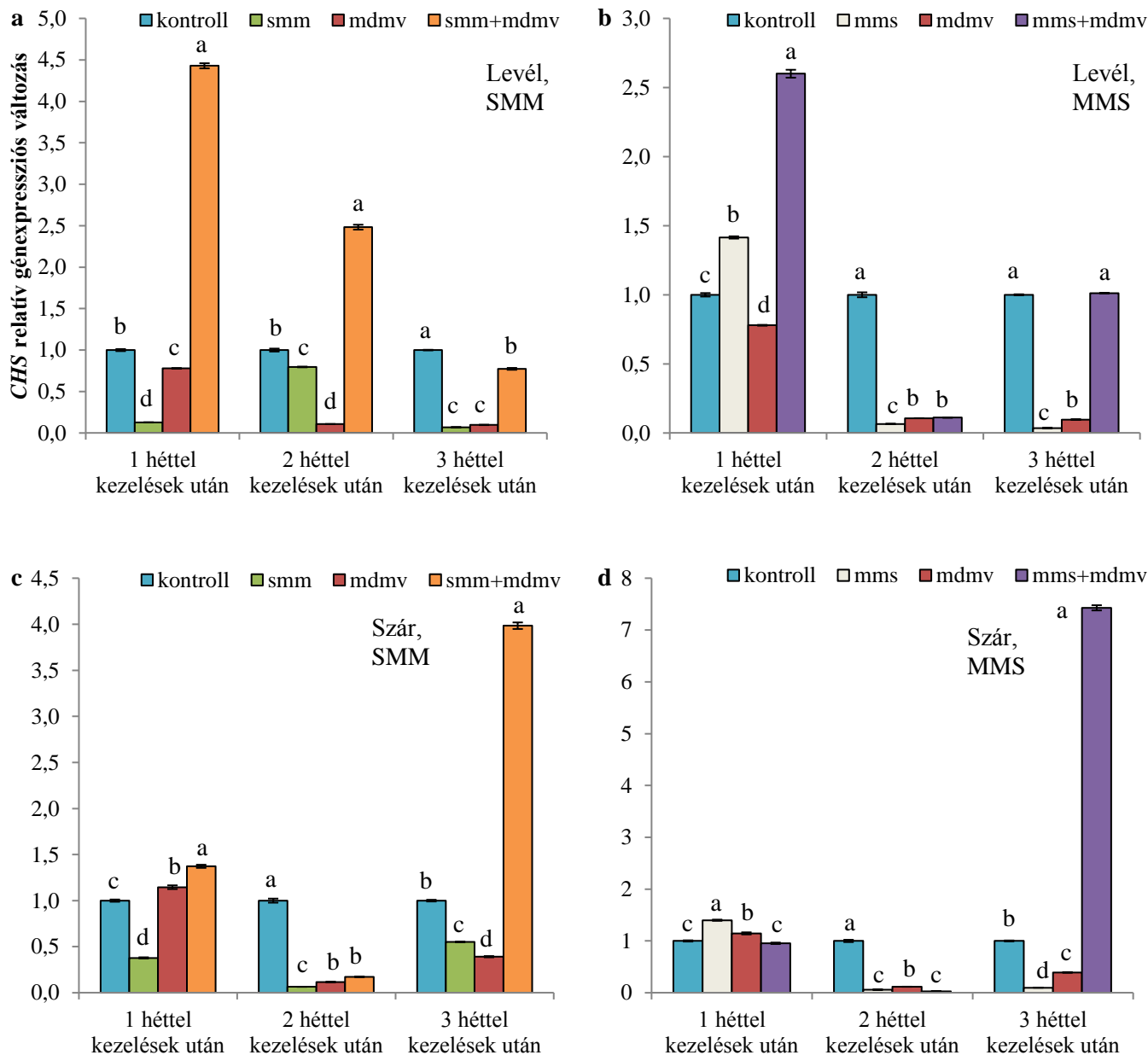
4.4.3.7. Az előkezelések hatása a *CHS* gén expressziójára fertőzött növényekben mérve

Az SMM-előkezelés már egy héttel a fertőzés után jelentősen emeli a gén expresszióját a növények levelében ($4,43 \pm 0,03$), mely folyamatosan csökken a hetek során (**14a ábra**). Az első héten a szárbán is magasabb génexpresszió mérhető *smm+mdmv*-nél ($1,37 \pm 0,02$), azonban jelentős emelkedés csak a harmadik héten figyelhető meg ($3,98 \pm 0,04$) (**14c ábra**).

Hasonló változások láthatóak MMS-kezelés hatására is. Levelekben az első héten szintén magasabb génexpresszió mérhető az *mms+mdmv* növényeknél ($2,6 \pm 0,03$), mely a második és a harmadik héten már nem figyelhető meg, gyorsabb a génexpresszió lecsengése, mint *smm+mdmv* növények levelében (**14b ábra**). A szárbán, hasonlóan, mint az *smm+mdmv*-nél jelentős növekedés a harmadik héten figyelhető meg ($7,43 \pm 0,05$), mely növekedés meghaladja az előbbi csoportban tapasztalt növekedést is (**14d ábra**).



13. ábra A *C4H* génexpressziós változásai 1, 2 és 3 héttel a kezelések után. Az **a** és **b** ábrán a különböző kezelések hatásai szerepelnek a növények levelében mérve, míg a **c** és **d** ábrákon ugyanezen növények szárában mért értékek láthatók. A statisztikai jelölés DMRT alapján készült, ahol a különböző betűk statisztikailag szignifikánsan eltérő eredményeket jelölnek, 5 %-os szignifikanciaszint mellett. A relatív ábrázolás miatt a statisztikai vizsgálatokat heti bontásban végeztem. *C4H*: fahéjsav-4-hidroxiláz, *smm*: SMM-kezelt növények csoportja, *mms*: MMS-kezelt növények csoportja, *mdmv*: MDMV-fertőzött növények csoportja, *smm+mdmv*: SMM-előkezelt fertőzött növények csoportja, *mms+mdmv*: MMS-előkezelt fertőzött növények csoportja.



14. ábra A *CHS* génexpressziós változásai 1, 2 és 3 héttel a kezelések után. Az **a** és **b** ábrán a különböző kezelések hatásai láthatóak a növények levelében mérve, míg a **c** és **d** ábrákon ugyanezen növények szárában mért értékek szerepelnek. A statisztikai jelölés DMRT alapján készült, ahol a különböző betűk statisztikailag szignifikánsan eltérő eredményeket jelölnek, 5 %-os szignifikanciaszint mellett. A relatív ábrázolás miatt a statisztikai vizsgálatokat heti bontásban végeztem. *CHS*: kalkon-szintáz, *smm*: SMM-kezelt növények csoportja, *mms*: MMS-kezelt növények csoportja, *mdmv*: MDMV-fertőzött növények csoportja, *smm+mdmv*: SMM-előkezelt fertőzött növények csoportja, *mms+mdmv*: MMS-előkezelt fertőzött növények csoportja.

4.5. Az antioxidáns enzimek aktivitásbeli és génexpressziós változásai

A vírusfertőzés számos károsodást okoz a növényben, melyek kivédésében az antioxidáns rendszernek van fontos szerepe. Munkám során 3 ilyen enzimnek vizsgáltam az aktivitásbeli és egyes izoformáinak a génexpressziós változásait: az APX-nak (*ZmAPX1.2*), GR-nak (*GRI*) és a GPX-nak (*ZmPEX70*). A vizsgálathoz a növények leveléből és gyökeréből is vettem mintákat, hogy teljes képet kapjak a növény védekezéséről. Az antioxidáns rendszer enzimeinek számos izoformája létezik, és számos tervezett primer közül választottuk ki a fent felsorolt izoformákra tervezett szakaszokat, melyek megfelelően működtek az ellenőrző vizsgálatok során, és eredményeim alapján jól tükrözik az enzim aktivitásbeli változását.

4.5.1. Az aszkorbát-peroxidáz génexpressziós és enzimkinetikai változásai

Az aszkorbát-peroxidáz egyike azon antioxidáns enzimeknek, melyek hatékonyan semlegesítik a reaktív oxigénformákat, így védelmet nyújtanak az oxidatív károsodásokkal szemben. Vizsgálatával feltérképezhető a kezelések szerepe a növényi védelem kialakításában.

4.5.1.1. A fertőzés hatása az APX aktivitására

1 héttel a kezelések után csekély mértékben emelkedik az enzimaktivitás a növények levelében ($1,51 \pm 0,08$), viszont a génaktivitás nem változik a *kontroll*hoz képest (**15. ábra**). A 2. és 3. héten szignifikánsan csökken az *mdmv* növények levelében mérhető génexpresszió ($0,002 \pm 0,0001$ és $0,003 \pm 0,001$), azonban ez a csökkenés csak a második héten figyelhető meg az enzimaktivitás adatokban ($0,62 \pm 0,06$).

1 héttel a kezeléseket követően emelkedik az enzimaktivitás ($1,52 \pm 0,1$) és a génexpresszió szintje is a növények gyökerében ($3,6 \pm 0,01$) (**16. ábra**). Amíg a génexpresszió a második ($0,003 \pm 0,0001$) és a harmadik héten ($0,027 \pm 0,001$) már jelentősen visszaesik, addig az enzimaktivitás értéke a második héten szignifikánsan magasabb, majd a harmadik héten a *kontroll* értékével megegyező.

4.5.1.2. Az SMM-kezelés hatásai az APX aktivitására

SMM-kezelt növények levelében 1 héttel a kezelések után nem látható szignifikáns változás az enzimaktivitás és a génexpressziós adatokban (**15a és b ábrák**). 2 és 3 héttel a kezelések után szignifikánsan csökken az enzim génjének expressziója a növények levelében a

*kontroll*hoz képest ($0,011 \pm 0,0001$ és $0,002 \pm 0,0001$). Ezzel együtt az enzimaktivásban nem tapasztalható jelentős változás.

1 héttel a kezelések után csökken a növények gyökerében az enzimaktivitás a *kontroll*hoz képest, viszont a génexpresszió nő (**16a** és **b ábrák**). 2 és 3 héttel a kezelések után jelentősen csökken a génexpresszió ($0,002 \pm 0,0001$ és $0,01 \pm 0,0001$), míg ezzel együtt az enzimaktivásban csökkenés a második héten figyelhető meg ($0,75 \pm 0,001$), a harmadik héten már nem tér el statisztikailag a *kontroll*tól.

4.5.1.3. Az MMS-kezelés hatása az APX enzimaktivására és génexpressziójára

1 héttel a kezelések után statisztikailag nő a levelekben mérhető enzimaktivitás ($1,58 \pm 0,28$), azonban génexpressziósan változás nem mutatható ki a *kontroll*hoz képest (**15c** és **d ábrák**). 2 héttel a kezelések után mind a két mért paraméter értéke jelentősen alacsonyabb a *kontroll*tól (enzimaktivitás: $0,27 \pm 0,03$, génexpresszió: $0,002 \pm 0,0001$). A harmadik héten a génexpressziós adatok még mindig alacsonyak ($0,001 \pm 0,0001$), viszont ez nem mutatkozik meg az enzimaktivitás értékében, az nem tér el a *kontroll*tól.

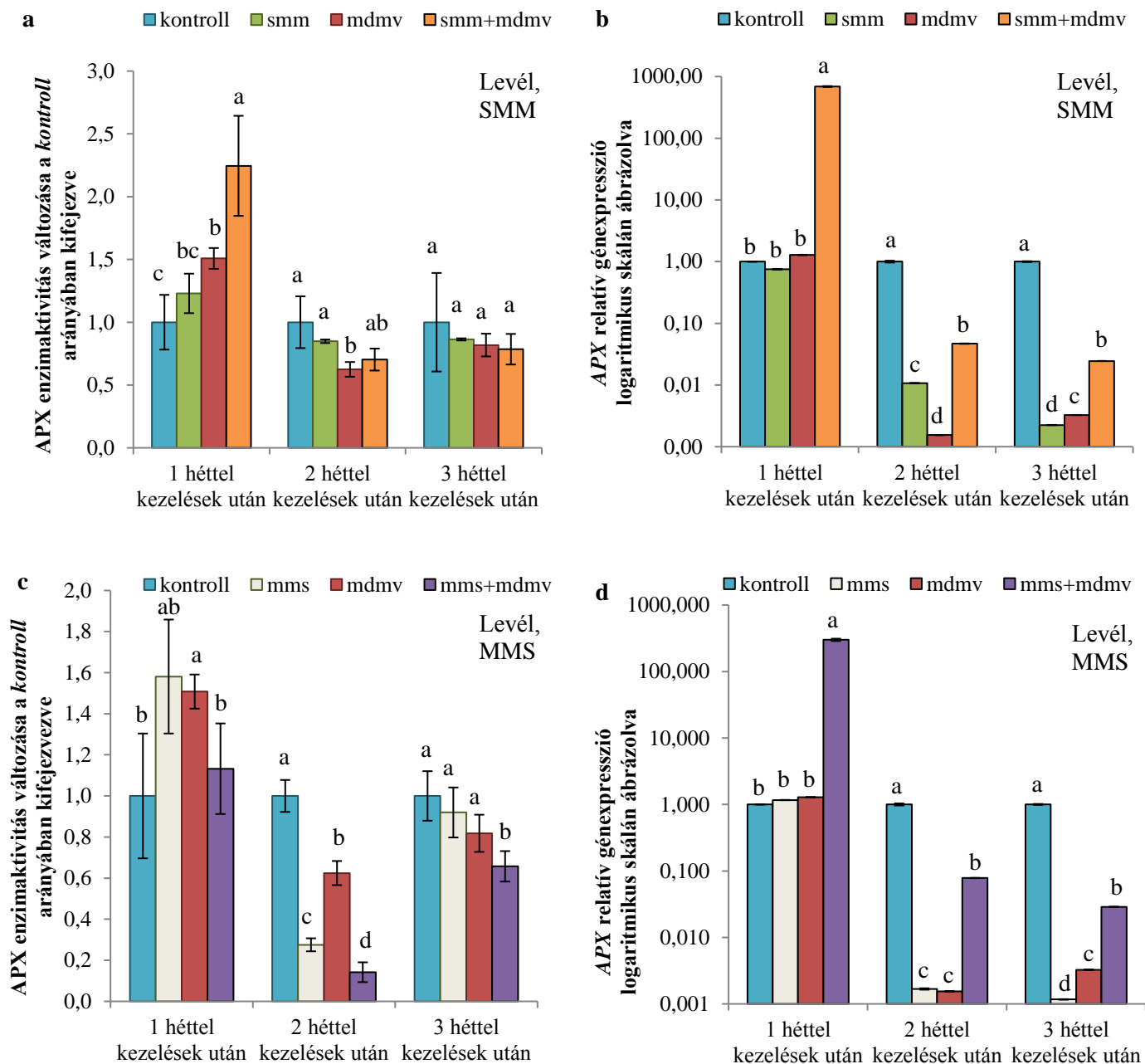
Az MMS-kezelés hatására enyhén nő a génexpresszió a növények gyökerében 1 héttel a kezelések után, viszont az enzimaktivitási adatokban nincs változás (**16c** és **d ábrák**). 2 és 3 héttel később jelentősen csökken a génexpresszió ($0,003 \pm 0,0001$ és $0,019 \pm 0,0001$), viszont ez nem mutatkozik meg az enzimaktivitási adatokban.

4.5.1.4. Az előkezelések hatása a fertőzött növényekben mérhető APX enzimaktivására és génjének expressziójára

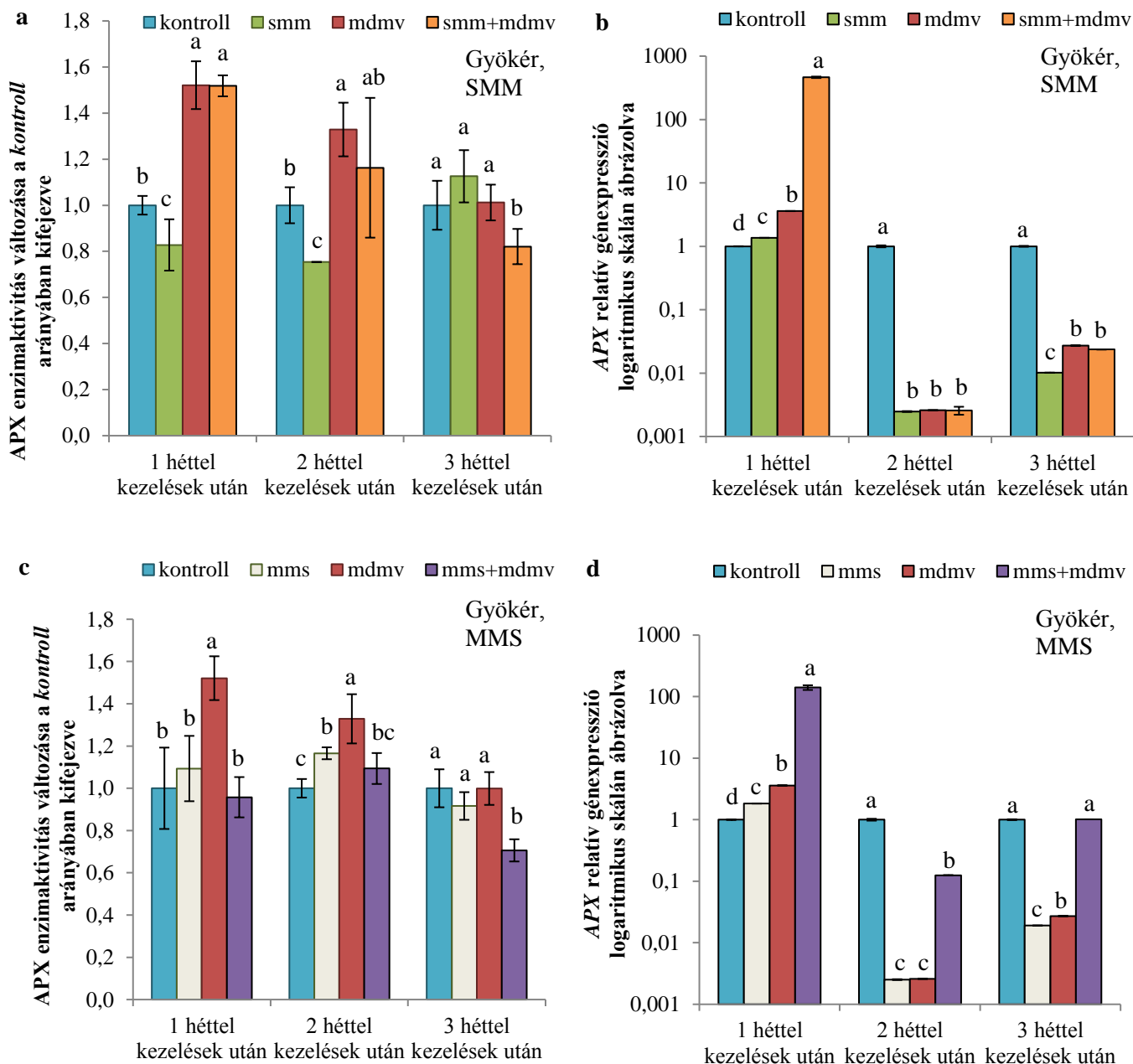
Fertőzött növények levelében mind a két előkezelés hasonló változásokat eredményezett (**15. ábra**). 1 héttel a kezelések után *smm+mdmv* ($688,85 \pm 12,2$) és *mms+mdmv* ($299,14 \pm 12,9$) növényeknél is többszörösre nőtt a génexpresszió mértéke. Ezzel megegyezően az *smm+mdmv* növényeknél az enzimaktivitás is jelentősen emelkedett ($2,24 \pm 0,4$), viszont *mms+mdmv*-nél ez nem volt megfigyelhető. 2 és 3 héttel a kezelések után mind a két vegyülettel előkezelt fertőzött növényeknél magasabb a génexpresszió szintje (*smm+mdmv*: $0,047 \pm 0,001$ és $0,024 \pm 0,001$, *mms+mdmv*: $0,078 \pm 0,001$ és $0,029 \pm 0,001$), mint az *mdmv* csoportnál, viszont szignifikánsan alacsonyabb a *kontroll*ban mérhető értéknél. Az *mms+mdmv* növények esetében az enzimaktivitás adatok is elmaradnak a *kontroll*ban mérhető értékektől. A második és a harmadik

héten az *mms+mdmv* növények értéke alacsonyabb a többi kezelési csoport értékénél ($0,14 \pm 0,05$ és $0,66 \pm 0,07$).

A növények gyökerében 1 héttel a kezelések után az *smm+mdmv* ($463,7 \pm 14,1$) és *mms+mdmv* ($140,6 \pm 3,2$) növényekben is jelentősen emelkedik az *APX* génjének az expressziója (**16. ábra**). Csekély emelkedés az enzimaktivásban az *smm+mdmv* növényeknél figyelhető meg ezen a héten ($1,52 \pm 0,05$), viszont statisztikailag nem tér el az *mdmv* értékétől. Az MMS-előkezelés az első hét folyamán alacsonyabb enzimaktivitást eredményez fertőzött növényekben ($0,96 \pm 0,09$), mint az *mdmv* csoportban. A második héten mind a két előkezelés jelentősen csökkentette a génexpresszió mértékét a *kontroll*hoz képest a fertőzött csoportokban (*smm+mdmv*: $0,003 \pm 0,001$, *mms+mdmv*: $0,125 \pm 0,001$), viszont az *mms+mdmv* még így is szignifikánsan meghaladta az *mdmv* növényekben mérhető génexpressziós értéket. Ugyanezen a héten az *mms+mdmv* növényekben szignifikánsan alacsonyabb az enzimaktivitás ($1,16 \pm 0,3$), mint az *mdmv* csoportban ($1,33 \pm 0,12$). A harmadik héten mind a két előkezelt fertőzött csoportnál csökken az enzimaktivitás (*smm+mdmv*: $0,82 \pm 0,08$, *mms+mdmv*: $0,71 \pm 0,05$). Az *smm+mdmv* növényeknél a harmadik héten is alacsony a génexpresszió értéke ($0,024 \pm 0,001$), statisztikailag megegyezik az *mdmv*-nél mérttel, viszont az *mms+mdmv* növényeknél emelkedés figyelhető meg a második héthez képest, és a harmadik héten már nem tér el a génexpresszió értéke a *kontroll* csoporttól.



15. ábra A növények levelében mérhető APX aktivitásbeli és génexpressziós változásai 1, 2 és 3 héttel a kezelések után. Az MDMV-fertőzés és SMM-kezelés hatásai az **a** és **b** ábrán láthatók (előbbin enzimaktivitás adatok, míg utóbbin a génexpressziós változások szerepelnek). A **c** és **d** ábrákon az MDMV-fertőzés és MMS-kezelés hatásai figyelhetők meg, hasonló módon feltüntetve. A statisztikai jelölés DMRT alapján készült, ahol a különböző betűk statisztikailag szignifikánsan eltérő eredményeket jelölnek, 5 %-os szignifikanciaszint mellett. A relatív ábrázolás miatt a statisztikai vizsgálatokat heti bontásban végeztem. *APX*: aszkorbát-peroxidáz, *smm*: SMM-kezelt növények csoportja, *mms*: MMS-kezelt növények csoportja, *mdmv*: MDMV-fertőzött növények csoportja, *smm+mdmv*: SMM-előkezelt fertőzött növények csoportja, *mms+mdmv*: MMS-előkezelt fertőzött növények csoportja.



16. ábra A növények gyökerében mérhető APX aktivitásbeli és génexpressziós változásai 1, 2 és 3 héttel a kezelések után. Az MDMV-fertőzés és SMM-kezelés hatásai az **a** és **b** ábrán szerepelnek (előbbin enzimaktivitás adatok, míg utóbbin a génexpressziós változások). A **c** és **d** ábrákon az MDMV-fertőzés és MMS-kezelés hatásai figyelhetők meg, hasonló rendszerrel feltüntetve. A statisztikai jelölés DMRT alapján készült, ahol a különböző betűk statisztikailag szignifikánsan eltérő eredményeket jelölnek, 5 %-os szignifikanciaszint mellett. A relatív ábrázolás miatt a statisztikai vizsgálatokat heti bontásban végeztem. APX: aszkorbát-peroxidáz, *smm*: SMM-kezelt növények csoportja, *mms*: MMS-kezelt növények csoportja, *mdmv*: MDMV-fertőzött növények csoportja, *smm+mdmv*: SMM-előkezelt fertőzött növények csoportja, *mms+mdmv*: MMS-előkezelt fertőzött növények csoportja.

4.5.2. A glutation-reduktáz enzimaktivitásának és génexpressziójának változásai

Az APX mellett a glutation-reduktáz is fontos szereplője az antioxidáns rendszernek, hiszen a glutation redukciójának szabályozásával többek közt az aszkorbát redukciós állapotát is befolyásolja.

4.5.2.1. A vírusfertőzés hatása a GR aktivitására

Az *mdmv* kukoricák levelében, 1 héttel a fertőzést követően jelentősen nő a GR enzim aktivitása ($2,24 \pm 0,09$), illetve az enzim génjének az expressziója is ($1,27 \pm 0,01$) (**17. ábra**). A második és a harmadik héten nem tér el az enzim aktivitása a *kontroll*ban mért értékekhez képest, viszont a gén expressziója jelentősen csökken (2. hét: $0,03 \pm 0,001$, 3. hét: $0,1 \pm 0,001$).

Egy héttel a kezelések után a fertőzött növények gyökerében szignifikánsan nő a *GR* gén expressziója ($3,95 \pm 0,03$), bár ez az enzimaktivitásban nem mutatkozik (**18. ábra**). *mdmv* növények gyökerében két héttel a kezelések után csökken az enzim aktivitása ($0,45 \pm 0,12$) a *kontroll* növényekhez képest. Két héttel a kezelések után csökken a gén kifejeződése ($0,12 \pm 0,001$), viszont egy héttel később újra növekedésnek indul, elérve a *kontroll*ban mért értéket.

4.5.2.2. Az SMM-kezelés hatása a GR aktivitására

1 héttel a kezelések után nő a levelekben az enzim aktivitása ($1,56 \pm 0,21$), azonban ezzel ellentétesen a gén expressziója csökken ($0,56 \pm 0,008$) a *kontroll*hoz képest (**17a és b ábrák**). A második ($0,18 \pm 0,001$) és a harmadik héten ($0,02 \pm 0,001$) tovább csökken a gén expressziója, viszont ez nem mutatkozik meg az enzim aktivitásában, továbbra is a *kontroll* szintjén marad.

A kukoricák gyökerében az első hét folyamán az enzimaktivitás a *kontroll* szintjén marad, azonban a második és a harmadik héten már jelentősen meghaladja azt (**18a és b ábrák**). A gén expressziója az első héten nem változik a *kontroll*hoz képest, majd a második ($0,13 \pm 0,001$) és harmadik héten ($0,27 \pm 0,002$) jelentős csökkenést mutat.

4.5.2.3. Az MMS-kezelés hatása a GR enzimaktivitására és génjének expressziójára

MMS-kezelés hatására a növények levelében szignifikánsan nő az első héten a GR enzimaktivitása ($1,38 \pm 0,12$) (**17c és d ábrák**). Ugyanezen a héten az enzim génjének az aktivitása nem mutat változást. A második és a harmadik héten nem változik az enzim aktivitása,

ezzel szemben szignifikánsan csökken a gén kifejeződése a *kontroll*hoz képest ($0,02 \pm 0,001$ és $0,04 \pm 0,001$).

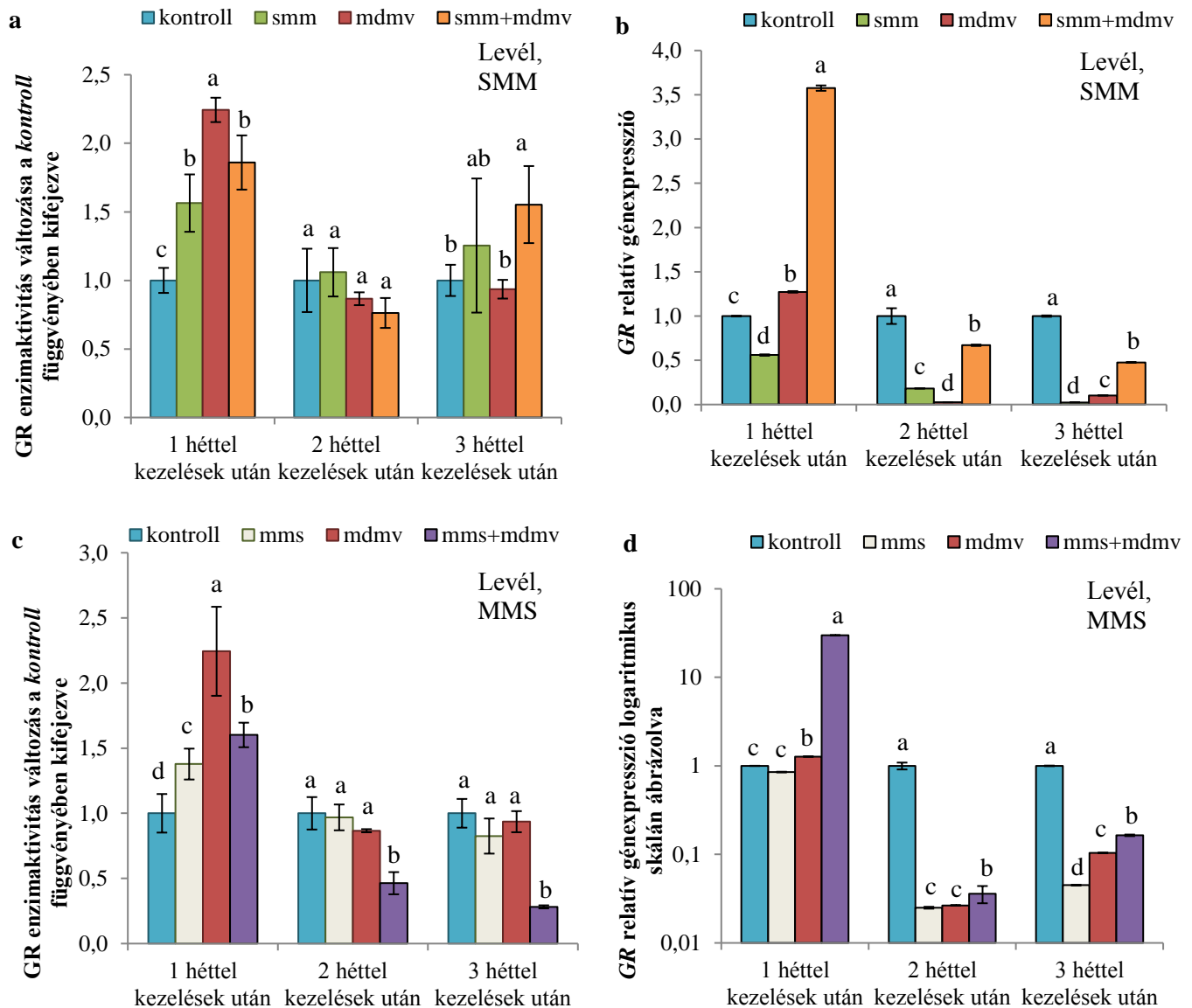
Az MMS-kezelés jelentősen növeli az enzimaktivitást ($1,6 \pm 0,08$) és a génexpressziót ($2 \pm 0,009$) a növények gyökerében 1 héttel a kezelések után (**18c** és **d ábrák**). A második héten szignifikánsan csökken az enzim aktivitása ($0,78 \pm 0,12$) és a második és a harmadik héten a gén kifejeződése ($0,12 \pm 0,002$ és $0,38 \pm 0,009$) az *mms* növényeknél a *kontroll* csoportokhoz képest.

4.5.2.4. Az SMM- és MMS-előkezelések hatása a GR aktivitására fertőzött növényekben

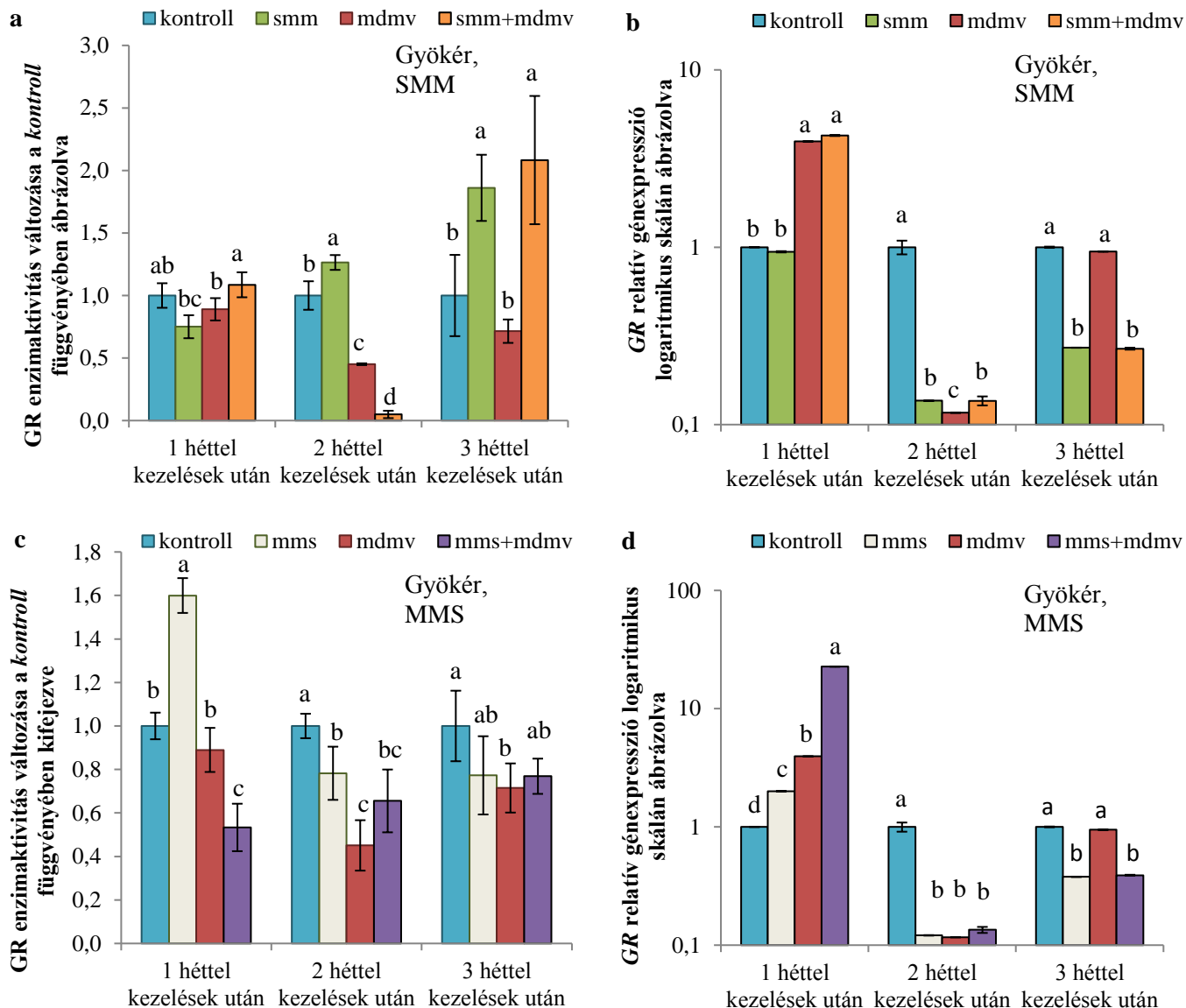
Az SMM-előkezelés növeli a *GR* génexpresszióját fertőzött növények levelében 1 héttel a kezeléseket követően, jelentősen meghaladva a többi kezelési csoportnál mérhető értéket ($3,58 \pm 0,03$) (**17a** és **b ábra**). A növények levelében az enzimaktivitás is nő ezen a héten ($1,86 \pm 0,2$), viszont szignifikánsan alacsonyabb az *mdmv* növények értékénél ($2,24 \pm 0,09$). 2 és 3 héttel a kezelések után a növények levelében az *smm+mdmv* növények génexpressziós értékei mindig meghaladják az *mdmv* növényekét (2. hét *smm+mdmv*: $0,67 \pm 0,01$, 2. hét *mdmv*: $0,03 \pm 0,001$, 3. hét *smm+mdmv*: $0,48 \pm 0,01$, 3. hét *mdmv*: $0,1 \pm 0,01$). Ezzel szemben az enzimaktivitás adatokban a második héten nincs változás, viszont a harmadik héten az *mdmv* növényekben mérhető érték felett vannak az előkezelt értékei (*smm+mdmv*: $1,55 \pm 0,28$, *mdmv*: $0,94 \pm 0,07$). A növények gyökerében is nő az enzim génkifejeződése egy héttel a kezelések után ($4,27 \pm 0,01$), viszont ez az aktivitásban nem figyelhető meg (**18a** és **b ábra**). 2 héttel a kezeléseket követően szignifikánsan csökken a növények gyökerében a génkifejeződés ($0,14 \pm 0,01$), mely a harmadik héten csak csekély mértékben nő ($0,27 \pm 0,01$), jelentősen elmaradva az *mdmv* értékétől. A második héten az *smm+mdmv* növények gyökereinek enzimaktivitás értéke ($0,05 \pm 0,03$) jelentősen alacsonyabb az *mdmv* növények adatainál ($0,45 \pm 0,01$). A harmadik héten az előkezelt és fertőzött növények gyökereinek enzimaktivitás értékei ($2,08 \pm 0,51$) jelentősen meghaladják az *mdmv* növényekét ($0,71 \pm 0,09$).

Az *mms+mdmv* növények levelében jelentősen nő a *GR* génexpressziója 1 héttel a kezelések után ($29,84 \pm 0,35$) (**17c** és **d ábra**). Az enzimaktivitás adatoknál nem ilyen számottevő a növekedés, ráadásul az *mdmv* növények enzimaktivitása ($2,24 \pm 0,09$) szignifikánsan meghaladja az *mms+mdmv* értékét is ($1,6 \pm 0,09$). A második és a harmadik héten az *mms+mdmv* növények levelében szignifikánsan csökken az enzimaktivitás a többi kezelési csoporthoz képest (2. hét: $0,46 \pm 0,08$, 3. hét: $0,28 \pm 0,01$). 1 héttel a kezelések után a növények

gyökerében az *mdmv* növények értéke alatt marad az enzimaktivitás (*mms+mdmv*: $0,53 \pm 0,11$, *mdmv*: $0,89 \pm 0,1$), viszont a génexpresszió jelentősen meghaladja azt (*mms+mdmv*: $22,67 \pm 0,08$, *mdmv*: $3,94 \pm 0,03$) (**18c** és **d ábrák**). A kísérlet következő hetében az *mms+mdmv* növényekben csekély mértékben ugyan, de magasabb enzimaktivitás ($0,65 \pm 0,14$) mérhető, mint az *mdmv* növényekben (enzimaktivitás: $0,45 \pm 0,12$). A harmadik héten az *mms+mdmv* növények gyökerében mért génexpressziós értékek ($0,39 \pm 0,01$) viszont szignifikánsan alacsonyabbak az *mdmv* növények értékénél ($0,95 \pm 0,02$).



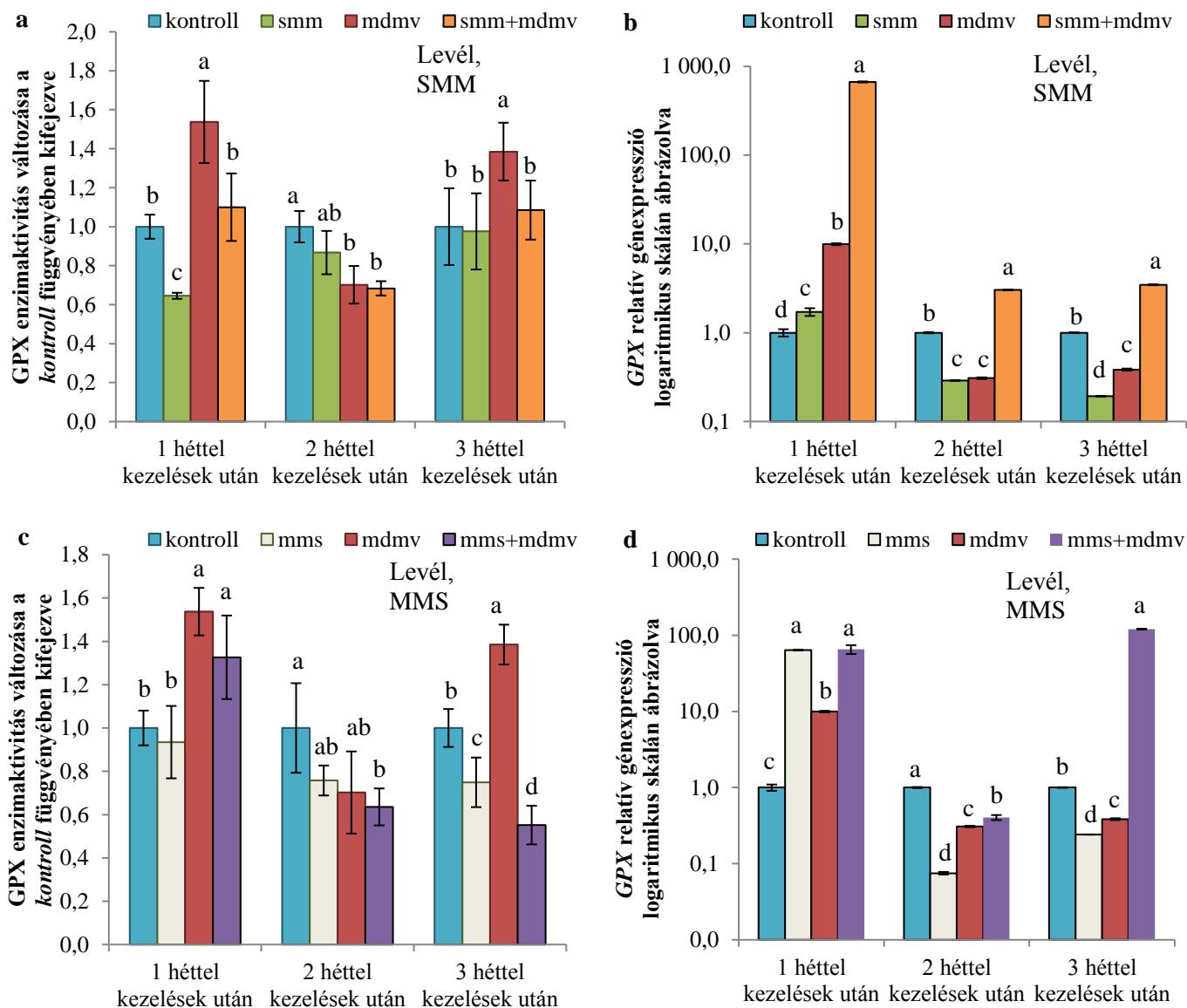
17. ábra A növények levelében mérhető GR aktivitásbeli és génexpressziós változásai 1, 2 és 3 héttel a kezeléseik után. Az MDMV-fertőzés és SMM-kezelés hatásai az **a** és **b** ábrán szerepelnek (előbbin enzimaktivitás adatok, míg utóbbin a génexpressziós változások). A **c** és **d** ábrákon az MDMV-fertőzés és MMS-kezelés hatásai figyelhetők meg, hasonló rendszerrel feltüntetve. A statisztikai jelölés DMRT alapján készült, ahol a különböző betűk statisztikailag szignifikánsan eltérő eredményeket jelölnek, 5 %-os szignifikanciaszint mellett. A relatív ábrázolás miatt a statisztikai vizsgálatokat heti bontásban végeztem. GR: glutation-reduktáz, *smm*: SMM-kezelt növények csoportja, *mms*: MMS-kezelt növények csoportja, *mdmv*: MDMV-fertőzött növények csoportja, *smm+mdmv*: SMM-előkezelt fertőzött növények csoportja, *mms+mdmv*: MMS-előkezelt fertőzött növények csoportja.



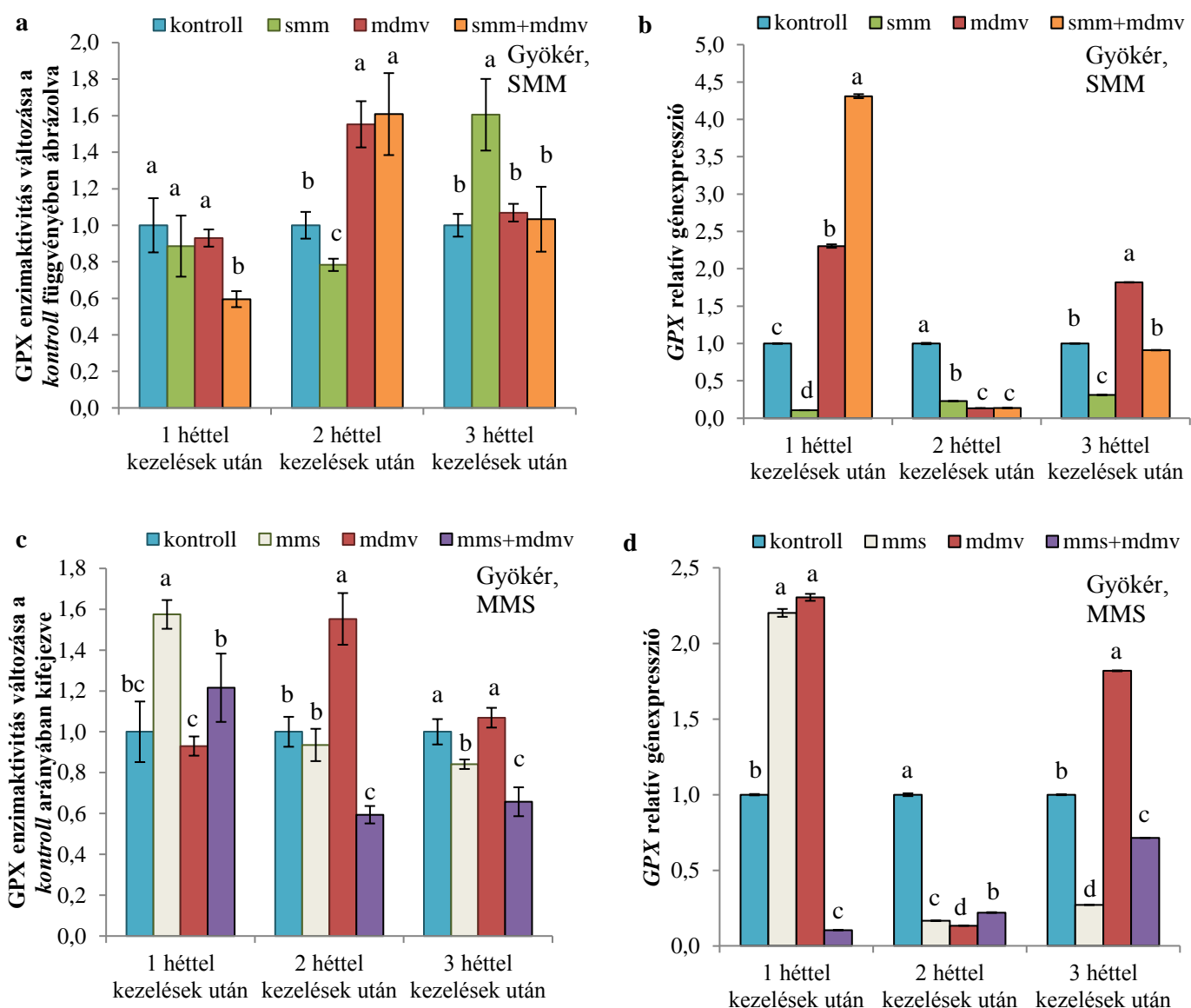
18. ábra A növények gyökerében mérhető GR aktivitásbeli és génexpressziós változásai 1, 2 és 3 héttel a kezelések után. Az MDMV-fertőzés és SMM-kezelés hatásai az **a** és **b** ábrán szerepelnek (előbbin enzimaktivitás adatok, míg utóbbin a génexpressziós változások). A **c** és **d** ábrákon az MDMV-fertőzés és MMS-kezelés hatásai láthatók hasonló rendszerrel feltüntetve. A statisztikai jelölés DMRT alapján készült, ahol a különböző betűk statisztikailag szignifikánsan eltérő eredményeket jelölnek, 5 %-os szignifikanciaszint mellett. A relatív ábrázolás miatt a statisztikai vizsgálatokat heti bontásban végeztem. GR: glutation-reduktáz, *smm*: SMM-kezelt növények csoportja, *mms*: MMS-kezelt növények csoportja, *mdmv*: MDMV-fertőzött növények csoportja, *smm+mdmv*: SMM-előkezelt fertőzött növények csoportja, *mms+mdmv*: MMS-előkezelt fertőzött növények csoportja.

4.5.3. A gvajakol-peroxidáz génexpressziós és enzimaktivitásbeli változásai

A gvajakol-peroxidáz átfogó védelmet nyújt gomba- vagy bakteriális fertőzések esetén, és hozzájárul a sebek gyógyulásához, így fontos szereplője az antioxidáns védekezésnek.



19. ábra A növények levelében mérhető GPX aktivitásbeli és génexpressziós változásai 1, 2 és 3 héttel a kezelések után. Az MDMV-fertőzés és SMM-kezelés hatásai az **a** és **b** ábrán láthatóak (előbbin enzimaktivitás adatok, míg utóbbin a génexpressziós változások szerepelnek). A **c** és **d** ábrákon az MDMV-fertőzés és MMS-kezelés hatásai láthatók hasonló rendszerrel feltüntetve. A statisztikai jelölés DMRT alapján készült, ahol a különböző betűk statisztikailag szignifikánsan eltérő eredményeket jelölnek, 5 %-os szignifikanciaszint mellett. A relatív ábrázolás miatt a statisztikai vizsgálatokat heti bontásban végeztem. GPX: gvajakol-peroxidáz, *smm*: SMM-kezelt növények csoportja, *mms*: MMS-kezelt növények csoportja, *mdmv*: MDMV-fertőzött növények csoportja, *smm+mdmv*: SMM-előkezelte fertőzött növények csoportja, *mms+mdmv*: MMS-előkezelte fertőzött növények csoportja.



20. ábra A növények gyökerében mérhető GPX aktivitásbeli és génexpressziós változásai 1, 2 és 3 héttel a kezeléseket követően. Az MDMV-fertőzés és SMM-kezelés hatásai az **a** és **b** ábrán láthatóak (előbbin enzimaktivitás adatok, míg utóbbin a génexpressziós változások szerepelnek). A **c** és **d** ábrákon az MDMV-fertőzés és MMS-kezelés hatásai láthatók hasonló rendszerrel feltüntetve. A statisztikai jelölés DMRT alapján készült, ahol a különböző betűk statisztikailag szignifikánsan eltérő eredményeket jelölnek, 5 %-os szignifikanciaszint mellett. A relatív ábrázolás miatt a statisztikai vizsgálatokat heti bontásban végeztem. GPX: gvajakol-peroxidáz, *smm*: SMM-kezelt növények csoportja, *mms*: MMS-kezelt növények csoportja, *mdmv*: MDMV-fertőzött növények csoportja, *smm+mdmv*: SMM-előkezelt fertőzött növények csoportja, *mms+mdmv*: MMS-előkezelt fertőzött növények csoportja.

4.5.3.1. A vírusfertőzés hatása a GPX aktivitására

A vírusfertőzést követő héten jelentősen emelkedik a növények levelében mérhető enzimaktivitás ($1,54 \pm 0,21$), és ezzel összhangban fokozódik a *GPX* génexpressziója is ($9,93 \pm 0,23$) (**19. ábra**). A második hétre csökken az enzimaktivitás ($0,7 \pm 0,1$), viszont egy héttel később már újra magasán a többi kezelés fölött van ($1,38 \pm 0,15$). Ezzel szemben viszont a génexpressziós adatok a második ($0,31 \pm 0,01$) és a harmadik ($0,38 \pm 0,01$) hét során végig a *kontroll* kezelés értéke alatt vannak.

A gyökerekben pont ellentétesen alakul az enzim aktivitása. Míg az első és a harmadik héten nem tér el szignifikánsan a *kontroll* növényekben mért értéktől, addig a második héten jelentősen meghaladja azt ($1,55 \pm 0,21$) (**20. ábra**). Ellentétes képet mutatnak a génexpressziós adatok, ugyanis fertőzött növények gyökerében szignifikáns emelkedés az első ($2,3 \pm 0,02$) és a harmadik ($1,82 \pm 0,01$) héten figyelhető meg, míg a második héten jelentős csökkenés tapasztalható ($0,13 \pm 0,01$).

4.5.3.2. Az SMM-kezelés hatásai a GPX aktivitására

1 héttel a kezelések után csökken az *smm* kukoricák levelében a GPX enzimaktivitása ($0,65 \pm 0,02$) (**19a ábra**). Ezzel szemben az enzim génjének az expressziója nő a *kontroll*hoz képest ($1,71 \pm 0,17$) (**19b ábra**). 2 és 3 héttel a kezelések után nem különbözik az *smm* növények enzimaktivitása a *kontroll*tól, viszont a génexpressziós aktivitása jelentősen csökken (2. hét: $0,29 \pm 0,01$, 3. hét: $0,19 \pm 0,01$).

A génexpressziós aktivitás a növények gyökerében is végig szignifikánsan alacsonyabb a *kontroll* növényekhez képest (1. hét: $0,11 \pm 0,01$, 2.hét: $0,23 \pm 0,01$, 3. hét: $0,31 \pm 0,01$) (**20b ábra**). Ettől eltérő eredményt adnak az enzimaktivitás adatok, hisz egy héttel a kezelések után az *smm* növények értéke megegyezik a *kontroll*al, két héttel később szignifikánsan alacsonyabb nála ($0,78 \pm 0,03$), míg a harmadik héten jelentősen meghaladja azt ($1,61 \pm 0,2$) (**20a ábra**).

4.5.3.3. Az MMS-kezelés hatása a GPX enzimaktivitására és a génexpressziójára

1 héttel a kezelések után nem változik az *mms* levelekben az enzimaktivitás a *kontroll*hoz képest (**19c ábra**). Ezzel szemben ugyanezen a héten jelentősen nő az enzim génjének a kifejeződése ($63,78 \pm 1,41$) (**19d ábra**). A második héten jelentősen csökken *mms* növényekben a gén kifejeződése ($0,07 \pm 0,001$) a *kontroll*hoz képest. A harmadik héten

szignifikánsan alacsonyabb az *mms* növények levelében mérhető enzimaktivitás ($0,75 \pm 0,11$), mely összhangban van a génexpressziós eredményekkel is ($0,24 \pm 0,001$).

A növények gyökerében, 1 héttel a kezelések után, mind az enzimaktivitás ($1,57 \pm 0,07$), mind a génexpressziós adatok jelentősen emelkednek ($2,2 \pm 0,03$) (**20c** és **d ábrák**). A következő hetekben a génexpressziós adatok markánsan csökkennek ($0,17 \pm 0,01$ és $0,27 \pm 0,01$), ezzel szemben ilyen szintű csökkenés az enzimaktivitás adatokban nem figyelhető meg.

4.5.3.4. Az előkezelések hatása a fertőzött növényekben mérhető GPX aktivitásra

Az SMM-előkezelés az első ($1,1 \pm 0,17$) és a harmadik ($1,08 \pm 0,15$) héten jelentősen csökkent a levelekben mérhető enzimaktivitás adatokat az *mdmv* növényekhez képest (**19a ábra**). 1 héttel a kezeléseket követően az *smm+mdmv* növények levelében óriási szintű génexpressziós növekedés tapasztalható ($667,9 \pm 8,7$), és a kísérlet további részében is végig szignifikánsan meghaladja ($3,03 \pm 0,03$ és $3,47 \pm 0,04$) az *mdmv*-ben mérhető génexpressziót ($0,31 \pm 0,01$ és $0,38 \pm 0,01$) (**19b ábra**). A növények gyökerében jelentős változás az első héten mérhető az enzimaktivitás adatokban. Az *smm+mdmv* növényekben szignifikánsan alacsonyabb az enzimaktivitás szintje ($0,6 \pm 0,04$), mint az *mdmv* növényekben ($0,93 \pm 0,05$), viszont a második és a harmadik héten már statisztikailag nem különbözik tőle (**20a ábra**). Ezzel ellentétesen alakul a génexpressziós mintázat, ugyanis 1 héttel a kezelések után az *smm+mdmv* növények gyökerében jelentősen nő a génexpresszió szintje a többi kezelési csoporthoz képest ($4,31 \pm 0,03$), majd csökkenést mutat ($0,14 \pm 0,01$), míg a harmadik héten már nem tér el a kontrolltól, de szignifikánsan az *mdmv* növényekben mérhető érték alatt van (*smm+mdmv*: $0,91 \pm 0,01$, *mdmv*: $1,82 \pm 0,01$).

Az *mms+mdmv* növények levelében hasonló enzimaktivitás adatokat mértem, mint az *smm+mdmv*-nél (**19. ábra**). Az előkezelés hatására a harmadik héten ($0,75 \pm 0,11$) szignifikánsan csökkent az aktivitás szintje az *mdmv*-hez képest, míg az első és a második héten nem mutatott eltérést. A levelekben mérhető génexpressziós adatok is hasonlóan alakultak az *smm+mdmv*-vel. Nem csak az MMS-kezelés, hanem az MMS-előkezelés is jelentősen emelte az első héten a génexpressziót ($65,3 \pm 0,44$). A második héten csökkent a génexpresszió ($0,4 \pm 0,002$), csekély mértékben haladva meg az *mdmv* szintjét, viszont a harmadik héten újra emelkedett ($120,47 \pm 10,1$), statisztikailag meghaladva a többi kezelési csoport értékét. A növények gyökerében már eltérő eredményt kaptam az *smm+mdmv* növényekhez képest (**20. ábra**). 1 héttel a kezelések

után jelentősen nő az *mms+mdmv* növények gyökerében az enzimaktivitás ($1,22 \pm 0,17$) az *mdmv* növényekhez képest. A második ($0,59 \pm 0,04$) és a harmadik ($0,66 \pm 0,07$) héten az enzimaktivitás viszont már szignifikánsan az *mdmv* növényekben mérhető érték alatt van. A génexpressziós változások alapján az *mms+mdmv* növények gyökerében jelentősen csökken a gén aktivitása 1 és 3 héttel a kezelések után (1. hét: $0,11 \pm 0,001$, 3. hét: $0,71 \pm 0,001$) az *mdmv* növényekhez képest (1. hét: $2,3 \pm 0,02$, 3. hét: $1,82 \pm 0,002$), míg a második héten statisztikailag meghaladja azt.

4.6. A vírusfertőzésre specifikusan magasabb expressziót mutató gének aktivitásának változásai

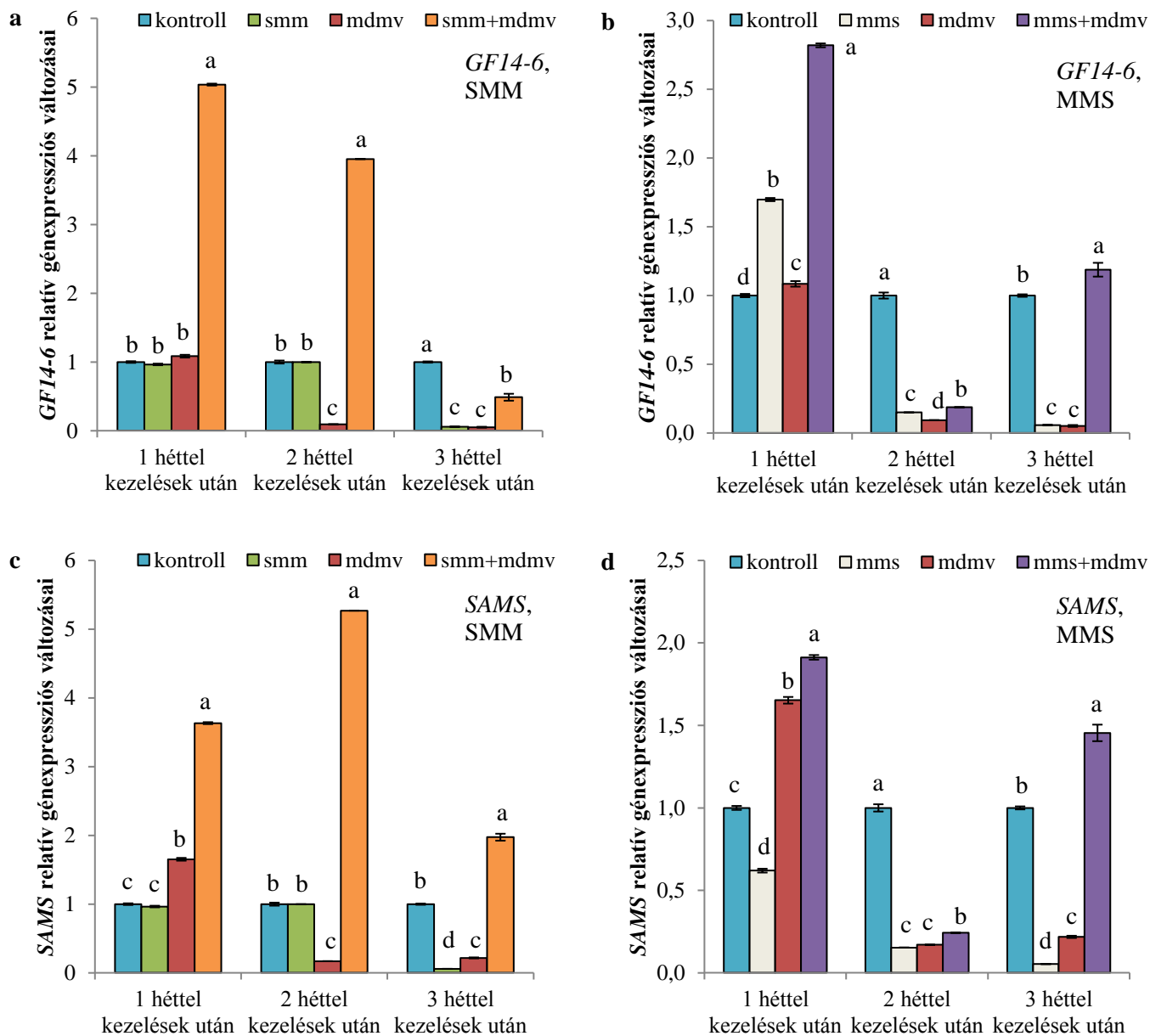
Szakirodalmi források alapján a *GF14-6* és a *SAMS* magas génexpressziót mutat MDMV fertőzés során (Uzarowska és mtsai 2009). Munkám során vizsgáltam, hogy ez az emelkedés Honey kukoricafajtán is kimutatható-e, illetve hogy az előkezelések módosítják-e ezen gének expresszióját.

4.6.1. Az SMM-kezelés és -előkezelés hatásai a *SAMS* és *GF14-6* aktivitására

Az SMM-kezelés az első és a második héten nem módosította egyik vizsgált gén aktivitását sem a *kontroll*hoz képest, viszont mind a két esetben a harmadik héten jelentős csökkenés figyelhető meg (*SAMS*: $0,06 \pm 0,001$, *GF14-6*: $0,06 \pm 0,001$) (**21a és c ábrák**). *mdmv* növényekben első héten nő a *SAMS* génexpressziója a *kontroll*hoz képest ($1,65 \pm 0,005$), viszont a második és a harmadik héten már mind a két génnél jelentős csökkenés figyelhető meg. Az SMM-előkezelés fertőzött növényeknél jelentősen módosította a génaktivitásbeli mintázatot. *GF14-6* esetében a legmagasabb expressziót 1 héttel a kezelések után mértem ($5,04 \pm 0,04$), majd a hetek során fokozatos csökkenés figyelhető meg (2. hét: $3,95 \pm 0,04$, 3. hét: $0,49 \pm 0,01$), viszont végig az *mdmv* növények szintje fölött marad a génexpresszió (2. hét: $0,09 \pm 0,001$, 3. hét: $0,05 \pm 0,001$). A *SAMS* esetében is végig magasabb a génexpresszió az *smm+mdmv* növényeknél, mint a többi kezelési csoportban, viszont a génexpresszió maximumát esetükben nem az első, hanem a második héten mértem (1. hét: $3,63 \pm 0,05$, 2. hét: $5,27 \pm 0,07$, 3. hét: $1,97 \pm 0,003$).

4.6.2. Az MMS-kezelés és -előkezelés hatásai a *SAMS* és *GF14-6* aktivitására

1 héttel a kezelések után az MMS-kezelés jelentősen emelte a *GF14-6* expresszióját a *kontroll* növényekhez képest ($1,69 \pm 0,02$) (**21b ábra**). Ezzel ellentétesen viszont csökkenést okozott a *SAMS* esetében ($0,62 \pm 0,004$) (**21d ábra**). A második és a harmadik héten mind a két gén esetében jelentősen csökken a vegyülettel kezelt növények levelében mérhető génaktivitás. Az MMS-előkezelés fertőzött növényekben mind a két génnél, mind a 3 vizsgált hét során jelentős emelkedést eredményezett az *mdmv* növényekhez képest. 1 héttel a kezelések után az *mms+mdmv* növényekben mérhető *GF14-6* génexpressziója jelentősen meghaladja a többi kezelési csoportban mérhető értéket ($2,82 \pm 0,04$), mely emelkedés a második hétre elvész ($0,19 \pm 0,002$), viszont a harmadik héten újra megfigyelhető enyhe növekedés ($1,19 \pm 0,005$). Hasonló tendencia játszódik le a *SAMS* esetében is (1. hét: $1,91 \pm 0,02$, 2. hét: $0,24 \pm 0,002$, 3. hét: $1,45 \pm 0,001$).



21. ábra MDMV-fertőzésre specifikusan expresszálódó gének változásai. A *GF14-6* változásai az **a** és **b** ábrán, míg a *SAMS* változásai a **c** és **d** ábrán szerepelnek. A statisztikai jelölés DMRT alapján készült, ahol a különböző betűk statisztikailag szignifikánsan eltérő eredményeket jelölnek, 5 %-os szignifikanciaszint mellett. A relatív ábrázolás miatt a statisztikai vizsgálatokat heti bontásban végeztem. *GF14-6*: G-boksz faktor 14-3-3 homológ fehérje, *SAMS*: S-adenozilmetionin-szintáz, *smm*: SMM-kezelt növények csoportja, *mms*: MMS-kezelt növények csoportja, *mdmv*: MDMV-fertőzött növények csoportja, *smm+mdmv*: SMM-előkezelt fertőzött növények csoportja, *mms+mdmv*: MMS-előkezelt fertőzött növények csoportja.

5. Eredmények értékelése

5.1. A vírus mennyiségi változásai

Kutatásom során arra a kérdésre kerestem a választ, hogy az előkezelések hatására változik-e a vírus mennyisége és eloszlása a növényen belül. Eredményeim alapján mind SMM-, mind MMS-kezelés hatására szingifikánsan csökken az MDMV mennyisége a növények levelében és gyökerében egyaránt (**4. ábra**).

Radwan és mtsai (2007) kimutatták, hogy a külsőleg hozzáadott SA csökkenteni képes a *cukkini sárga mozaik vírus* mennyiségét tökbén. Munkájuk során pozitív korrelációt figyeltek meg az SA koncentrációjának növelése és a vírus köpenyfehérjének csökkenése között. A vegyület számos ponton képes gátolni a vírus szaporodását és mozgását a növényen belül, továbbá fokozza az RNS-csendesítés folyamatát is (Singh és mtsai 2004).

Az SMM és az SA (a növény számára optimális koncentrációban alkalmazva) egyaránt pozitívan hat a növény élettani állapotára, viszont ezen hatások kevésbé magyarázzák a kezelések víruscscökkentő hatását. A növényi védelem fokozásával hozzájárulnak a vírus szaporodásának a visszaszorításához, viszont a vegyületek hatása és így a válaszreakció is bonyolult biokémiai hálózatok eredménye. A vírus visszaszorításának a hátterében számos tényező állhat, így nem elhanyagolható a fenilpropanoid bioszintézis útvonal vagy az antioxidáns rendszer közreműködése sem. A hatás pontos megértéséhez ezért számos élettani és molekuláris biológiai vizsgálatot végeztem, melynek eredményeit a következő alfejezetek tartalmazzák.

5.2. A klorofilltartalom és a nem-fotokémiai kioltás változásai

5.2.1. Az MDMV-fertőzés hatása a klorofilltartalomra

Munkám során vizsgáltam, hogy MDMV-fertőzés, továbbá SMM- és MMS-kezelések hatására hogyan változik a fotokémiai rendszer épsége. A fotoszintetikus elektrontranszportlánc aktivitása mellett a klorofilltartalom változásait is figyelemmel követtem.

Irodalmi forrásokból ismert, hogy az MDMV a kloroplasztiszok külső membránját használja fel szaporodásához. A fertőzés során feltöredezik ezen organelumok tilakoidmembránja, és ennek következtében csökken a klorofilltartalom. A fotoszintézis csökkenésével és ezáltal a szénanyagcsere sérülésével pedig törpenövés jelenik meg (Musetti és mtsai 2002, Wei és mtsai 2010). Zaitlin és Jagendorf (1960) kísérleteik során dohánynövényeket

fertőztek TMV-vel, és a fertőzött levelekben vizsgálták a fotokémiai rendszer változásait. Eredményeik alapján a vírusfertőzött leveleken klorózis jelent meg, csökkent a fotoszintetikus aktivitás, a klorofilltartalom és a Hill-reakció intenzitása is. Roberts és Wood (1982) szintén dohány modellnövényben vizsgálták az *uborka mozaik vírus* fertőzés hatásait. A fertőzés következtében csökkent a kloroplasztiszok mérete, és ezzel együtt csökkent a gránumtilakoidok száma is, melynek eredményeképpen kevesebb klorofillmolekulával rendelkeztek a fertőzött levelek. Számos más kutatás is igazolta a klorofilltartalom csökkenését vírusfertőzött növényekben:

- ☞ Osmond és mtsai (1998) selyemmályvában *selyemmályva mozaik vírus*;
- ☞ Naidu és mtsai (1984) földimogyoróban *földimogyoró mozaik vírus*;
- ☞ Guo és mtsai (2005) mustárban *fehértárka mozaik vírus*,
- ☞ és Almási és mtsai (2000) árpában *árpa csíkos mozaik vírus* fertőzés hatására.

Az irodalmi források alapján, továbbá látva a mozaikos mintázatot, azt az eredményt várnánk, hogy *mdmv* kukoricalevelekben csökken a klorofilltartalom. Meglepő módon azonban különböző kukoricavonalakban a vírusfertőzés eltérően hatott a klorofilltartalom változásaira. Amíg Jubilee kukoricafajtnál csökken a klorofillmolekulák mennyisége (**5. ábra**), addig Honey kukoricánál (**6. és 7. ábrák**) nem látható szignifikáns csökkenés *mdmv* egyedekben két és három héttel a fertőzést követően, noha a mozaikos mintázat megfigyelhető és az ELISA és a qRT-PCR adatok is igazolták a fertőzés meglétét (**4. ábra**). A különbséget magyarázhatja, hogy az eltérő kukoricafajták különbözőképpen reagálnak a fertőzésre. Ezt támasztja alá Musetti és mtsai (2002) munkája is, akik számos kukoricafajtn vizsgálták MDMV és *árpa sárga mozaik vírus* kettős fertőzésének a hatásait. Megfigyelték, hogy a különböző kukoricavonalak eltérően reagáltak a vírusfertőzésre és voltak olyan egyedek is, ahol károsodás sem volt megfigyelhető.

Doktori munkámban a klorofilltartalom mérését leszámítva minden vizsgálatot Honey csemegekukoricán végeztem, így a továbbiakban már nem jelölöm meg külön a kukoricafajtat.

5.2.2. A nem-fotokémiai kioltás paramétereinek változásai vírusfertőzés hatására

A klorofilltartalom változásának vizsgálata mellett a klorofillmolekulák fluoreszcenciájának mérésével lehetőség nyílik a fotokémiai rendszerek állapotának feltérképezésére is. Ezáltal pontosabb képet kaphatunk a rendszer működéséről és esetleges

sérüléséről. A nem-fotokémiai kioltás (NPQ) fontos szerepet játszik a fölösleges gerjesztési energia elvezetésében, mely által védi a fotoszintetikus rendszert (Baker 2008). Vírusfertőzés során sérül a Benson-Calvin ciklus, melynek eredményeképpen nő a lumen pH-ja, ami további emelkedést eredményez az NPQ értékében (Ruban és Horton 1995). A fotokémiai károsodás kivédéséhez további védelmi mechanizmus alakult ki a növényeknél: a PS I ciklikus elektrontranszportot alakít ki, mellyel a növény elvezetheti a fölös energiát. Ez a ciklikus elektrontranszport tovább módosítja a pH-gradienst a tilakoid membrán két oldalán, melynek eredményeképpen hatást fejt ki az NPQ értékére is (Karpinski és mtsai 2003, Yamori és Shikanai 2016).

Eredményeim alapján vírusfertőzés hatására erősödik a qE (Δ pH-függő kioltás), mely jellemzően a fertőzés harmadik hetében jelenik meg, és ezzel együtt csökken a qT (state-tranzíció függő kioltás) (8. és 9. ábra). Fotoinhibíció az első és a harmadik héten nem figyelhető meg fertőzés hatására, ami összhangban van a változatlan klorofilltartalommal. Ugyancsak 3 héttel a fertőzést követően csökken a $\Phi_{PS II}$ (10. és 11. ábra), ezzel együtt nő a Φ_{NF} ; noha ez nem eredményez jelentős károsodást. A $\Phi_{f,D}$ nő fertőzés hatására, míg a Φ_{NPQ} csökken. A megfigyelésekből az vonható le, hogy MDMV-fertőzött Honey kukoricák levelében csökken a PS II reakciócentrumok hatékonysága és erősödnek a fluoreszcencia és hődisszipációs útvonalak, viszont a károsodás nem jelentős, hisz klorofilltartalom-veszteséget vagy fotoinhibíciót nem okoz. Hasonló eredményt kaptak Chaerle és mtsai (2006), akik *paprika enyhe tarkulás vírussal* fertőzött dohánynövényeknél nem tapasztaltak klorofilltartalom-csökkenést, viszont sérült a PS II aktivitása.

Pérez-Bueno és mtsai (2006) sem tapasztaltak klorofilltartalom-csökkenést, akik szintén a *paprika enyhe tarkulás vírus* fertőzésének hatásait vizsgálták dohánynövényekben. Eredményeik alapján vírusfertőzés hatására felborul a Benson-Calvin ciklus egyensúlya, és ennek következtében megemelkedik az intratilakoidális pH grádiens, melynek következtében nő az NPQ a vírusfertőzött részekben. Eredményeim alapján MDMV-fertőzés során is nő a Δ pH-függő kioltás, illetve fokozódnak fluoreszcencia és hődisszipációs útvonalak, ami magyarázható a Benson-Calvin ciklus sérülésével. Hasonló eredményt kaptak Rahoutei és mtsai (2000) is.

Hodgson és mtsai (1989) TMV-vel fertőzött spenótnövények levelében megfigyelték a vírus köpenyfehérjének a felhalmozódását a tilakoidmembránok PS II komplexében. Ennek eredményeképpen csökkent a fotoszintetikus elektrontranszport a fertőzött területen.

Feltételezhető, hogy MDMV-fertőzés során is hasonló köpenyfehérje-tilakoidmembrán kapcsolatok alakulnak ki, melyek felelősek lehetnek a PS II reakciócentrumok hatékonyságának csökkenéséért és a fluoreszcencia és hődisszipációs útvonalak erősödéséért. Ezt az elképzelést támasztja alá Balachandran és mtsai 1994-es munkája is, melyben dohánynövényeken vizsgálták a TMV-fertőzés hatásait. Fertőzött növényekben csökkent a fluoreszcencia hozama, ami szerintük azzal magyarázható, hogy a vírusköpenyfehérjék kapcsolatot létesíthetnek a PS II reakciócentrumokkal, melynek eredményeképpen fluoreszcencia kioltó központokat hoznak létre (Hodgson és mtsai 1989, Reneiro és Beachy 1986). Emellett a klorofillmolekulák aggregálódhatnak az antennakomplexekben, ezáltal alakíthatnak ki kioltó központokat (Beddard és Porter 1976). Ezek a folyamatok együttesen járulnak hozzá a ΔpH érték emelkedéséhez, mely növekedést nekem is sikerült kimutatnom. A vírusok nem-fotokémiai kioltásra gyakorolt hatását Chaerle és van der Straeten (2000) is igazolták.

5.2.3. Az SMM-kezelés hatása a klorofilltartalom változására

Munkám során vizsgáltam az SMM-kezelés hatását stresszmentes körülmények között nevelt, valamint a kezelést követően fertőzésnek kitett növényeken is. A vegyület fotokémiai rendszerekre kifejtett hatását számos korábbi tanulmány igazolta, azonban ismereteim szerint ez az első kutatás, mely vírushoz fertőzött növényeken vizsgálja a vegyület hatásait.

Rácz és mtsai (2008) kimutatták, hogy hidegkezelést követően az SMM-előkezelés csökkentette az elektrolitok kiáramlását a membránokon keresztül. Megfigyelték továbbá, hogy a vegyülettel történő kezelés hatására nőtt a spermidin és putreszcin szintje a növényekben. Ezen poliamionok kationos tulajdonsággal rendelkeznek, melynek köszönhetően kapcsolatot alakítanak ki a membránfehérjék negatív oldalláncaival, így kötődésük révén stabilizálják a szerkezetet, és ezzel magyarázható az SMM membránvédő tulajdonsága. Cohen és mtsai (1979) bizonyították, hogy poliamin-előkezeléssel kivédhető a klorofilltartalom csökkenése és megőrződik a tilakoidmembránok integritása is. Vizsgálataikhoz spermint, spermidint és putreszoint használtak. Ezen vegyületek szintéziséhez hozzájárul az SMM-ciklus, ezáltal SMM-előkezeléssel növelhető a mennyiségük a növényekben. Hasonló eredményt értek el Kósa és mtsai (2011) is, akik hideg- és fagystressznek kitett kukoricánövényeket kezeltek SMM-mel.

Eredményeim alapján SMM-mel kezelt Jubilee kukoricákban 1 héttel a kezelést követően szignifikánsan nőtt a klorofilltartalom, ami az SMM membránvédő tulajdonságának köszönhető.

Hasonló növekedést tapasztaltam az *smm+mdmv* csoportban is, melyekben már 2 és 3 héttel a kezelések után magasabb volt a klorofilltartalom, mint az *mdmv* csoportokban (**5. ábra**). A Honey fajtánál az SMM-kezelés nem okozott jelentős változást a klorofilltartalomban (**6. ábra**).

5.2.4. Az SMM-kezelés hatása a nem-fotokémiai kioltás paramétereire

Nagyobb különbségeket kaptam a klorofill-fluoreszcencia változásait vizsgálva. A kezelés már önmagában befolyásolta a paraméterek változásait. *Kontroll* növényekkel összevetve 2 héttel a kezelések után jelentősen nő a qE , azonban a kísérlet további részében nem tér el tőle (**8. ábra**). Érdeklődés, hogy amikor a kezelést követően megfertőztem a növényeket, akkor egy héttel a kezelések után a qE értéke nő az *mdmv* értékéhez képest, viszont a kísérlet harmadik hetén már jelentősen csökken, ami jelzi, hogy az előkezelés vírusfertőzés során képes mérsékelni a károsodásokat.

smm növényekben csökken a qT , viszont 2 és 3 héttel a kezelések után *smm+mdmv*-nél nő az értéke (**8. ábra**). A qT folyamatával a növény elvezeti a fölösleges energiát, melyre a fotoszintetikus elektrontranszportláncsal nincs lehetősége, így csökkenti a rendszerek károsodását és megőrzi integritásukat. Az SMM-előkezelés ezáltal járul hozzá a fölösleges energia elvezetéséhez, mely a vírusfertőzés hatására jelenik meg.

Meglepő módon az SMM-kezelés fotoinhibíciót vált ki (**8. ábra**), ami jelzi, hogy a vegyület enyhe stresszt jelent a növénynek. A második és harmadik héten az *smm+mdmv*-nél alacsonyabb a qI értéke az *smm* növények értékénél, mely a kísérlet második hetében szignifikánsan az *mdmv* növényekben mérhető érték alatt van.

SMM-kezelés hatására a harmadik héten csökken a $\Phi_{PS II}$, ezzel együtt nő a Φ_{NF} (**10. ábra**). *smm+mdmv* növényekben nő a $\Phi_{PS II}$ értéke az *smm* és *mdmv* növényekhez képest, továbbá alacsonyan marad a Φ_{FD} értéke, ami jelzi a vegyület védő hatását.

Az eredményekből látható, hogy noha az SMM-kezelés enyhe stresszt jelent a növénynek, vírusfertőzés során, membránvédő hatásának köszönhetően, védelmet nyújt a fotokémiai rendszereknek és biztosítja megfelelő működésüket. Továbbá, az ELISA és a qRT-PCR adatok alapján megfigyelhető, hogy az SMM-előkezelés hatására csökken a növények levelében és gyökerében a vírus mennyisége, ami szintén hozzájárul a fotokémiai rendszer károsodásának csökkenéséhez (**4. ábra**).

5.2.5. Az MMS-kezelés hatása a klorofilltartalomra és a PS II-re

Az MMS egy kombinált vegyület, mely az SMM és SA összekapcsolásával született meg. Megértéséhez ismernünk kell a két alkotóvegyület hatásait is. Az SMM-kezelés eredményeit az előző alfejezetben tárgyaltam, viszont szólni kell az SA hatásairól is. Széles az SA irodalma, hisz a növényi védekezésben és fejlődésben betöltött szerepe már régóta ismert. A membránokra kifejtett védőhatását Shi és mtsai (2006) igazolták hőkezelt uborkákon (1 mM koncentrációban alkalmazták az SA-t). Az SA megfelelő koncentrációban növeli az aktív PS II reakciócentrumok hatékonyságát, javítja stresszhatásnak kitett kukoricánövények állapotát és növeli a növények klorofilltartalmát is (Khodary 2004, Shi és mtsai 2006).

Moharekar és mtsai (2003) igazolták, hogy az SA alacsony koncentrációban jótékonyan hat árpa és búza növények klorofilltartalmára, viszont magasabb koncentrációban (200 mg/kg) már csökkenti azt. A vegyület magas koncentrációban sztómazáródást okoz, ami gátolja a Calvin-ciklust. Ennek következtében csökken a PS II kvantumhatékonysága és a lineáris elektrontranszport is. A Calvin-ciklus blokkolásával feldúsul az ATP és NADPH a növényekben, ami fokozza a ΔpH -változás mértékét, növeli az NPQ-t és csökkenti az aktív PS II-k számát. A megemelkedett ATP és NADPH szint emellett redukálja a PS II-t, ami reaktív oxigénformák megjelenését eredményezi, melyek tovább csökkentik az aktív PS II-k számát. Végeredményben a vegyület magas koncentrációban oxidatív stresszt vált ki, melynek köszönhetően csökken a fénygyűjtő antennakomplexek mérete és nő a védő hatású karotinoidok és xantofilok mennyisége is (Janda és mtsai 2012, Mateo és mtsai 2006).

Eredményeim alapján az MMS-kezelés hatására nem változott szignifikánsan a Honey csemegekukoricák klorofilltartalma (**7. ábra**). A kezelés hatással van viszont az NPQ paramétereire. Az MMS-kezelés csökkenti a qE -t, mely az *mms* és *mms+mdmv* csoportoknál is megfigyelhető (**9. ábra**). A vegyület fokozza a qT -t az *mms* növényeknél, és az *mms+mdmv* növényeknél a harmadik héten, ami arra utal, hogy a PS II antennakomplexek leválásával a növény hatékonyabban tudja elvezetni a fölösleges energiát és ezzel képes kivédeni a fotokémiai rendszereket érő károsodásokat. Egy héttel a kezelés után az MMS-kezelés enyhe fotoinhibíciót okoz, viszont ez már nem figyelhető meg 1 és 2 héttel később. Az MMS-kezelés nincs hatással a $\Phi_{PS II}$ -re és a $\Phi_{f,D}$ -re (**11. ábra**). A vegyület csökkenti a Φ_{NPQ} -t, viszont csekély mértékben növeli a Φ_{NF} értékét. Az *mdmv* növényeknél tapasztalt csökkenés a $\Phi_{PS II}$ értékében nem figyelhető meg *mms+mdmv* növényeknél, ami jelzi, hogy a vegyület megvédte a PS II reakciócentrumokat.

Ugyanezt a megfigyelést támasztja alá, hogy amíg *mdmv* növényeknél nőtt a $\Phi_{f,D}$, addig *mms+mdmv* növényeknél ez nem figyelhető meg. *mms+mdmv* növényeknél alacsony értéken marad a Φ_{NPQ} , továbbá csökken a Φ_{NF} is. Az eredményekből látható, hogy az MMS-kezelés fertőzés során védelmet nyújt a fotokémiai rendszereknek, köszönhetően az SMM és SA membránvédő hatásának. Emellett az MMS-kezelés hatására csökken a vírus mennyisége a növények levelében és gyökerében egyaránt (**4. ábra**), így csökkentve a fotokémiai rendszerekre kifejtett károsodás mértékét.

5.3. A stresszvédelemben szerepet játszó fenoloidszármazékok mennyiségi változásai

A növények sokrétűen képesek védekezni az őket ért stresszhatásokkal szemben. Ide sorolhatóak a védekezésben szerepet játszó másodlagos anyagcseretermékek is, melyek nagyrészt a fenoloidszármazékokhoz sorolhatók. Ezen vegyületek több formában is előfordulnak a növényekben. A sejtfalhoz egyaránt kötődő és oldott formában is jelen levő fahéjsavak és flavonoidok jellemzően a 440 és 520 nm-es fluoreszcenciaemissziós sávokhoz (F440, F520) járulnak hozzá, amennyiben UV-fénnyel gerjesztik őket. Az előbbi fő forrása lehet a ferulasav, mely kovalensen kötődik a sejtfal szénhidrátoldalláncaihoz, és jellemzően a levél epidermisz sejtrétegében, főleg a levélerek mentén fordul elő (Lichtenthaler és Schweiger 1998, Morales és mtsai 1996). Ezzel szemben a zöld fluoreszcencia (520 nm) számos más másodlagos anyagcseretermékéből is származhat, úgymint a kvercetinből, berberinből vagy akár riboflavinokból (Lang és mtsai 1991, Monago-Maraña és mtsai 2016). Ezen két hullámhossztartomány mérésével információt kapunk a vegyületek mennyiségi és minőségi eloszlásáról a növényekben (Buschmann és Lichtenthaler 1998). Az első méréseket Chappelle és mtsai (1985) végezték, és ők írták le először a módszert is. Azóta széles körben alkalmazzák, mint nem-invazív mérési technikát.

Munkám során számos módszerrel vizsgáltam a fenoloidszármazékok mennyiségi és minőségi változását vírusfertőzés, illetve a kezelések hatására. Mértém az F440 és F520 értékeket, mellyel vizsgáltam a különböző vegyületcsoportok előfordulását a kezelések függvényében. Fotometriás módszerrel mértem összfenoloid-tartalom változást a növények leveléből és szárából egyaránt, hogy képet kapjak a növényi részek közti eloszlásukról. Végül pedig génexpressziós vizsgálatokkal is nyomon követtem a fenilpropanoid bioszintézis útvonal változásait a különböző növényi részekben a kezelések hatására. Vizsgáltam két, a fenilpropanoid

bioszintézis útvonalon fontos szerepet játszó gén aktivitásbeli változását: a *C4H*-nak, mely a útvonal korai szakaszában tölt be fontos szerepet; illetve a *CHS* változásait, mely a bioszintézis útvonal későbbi pontján jelentős.

5.3.1. A vírusfertőzés hatása a fenoloidszármazékok változására

Vírusfertőzött növényekben jelentősen változik a védő hatású fenoloidszármazékok eloszlása. *mdmv* növények levelében egy héttel a kezelés után csökken a 440 nm-es fluoreszcencia értékkel rendelkező fenoloidszármazékok mennyisége (**9. táblázat**). Ezzel szemben nő a levelekben összfenoloid-tartalom, melyet a génexpressziós vizsgálatok is alátámasztanak: a fenilpropanoid bioszintézis útvonal kezdetén helyet foglaló *C4H*-nak jelentősen emelkedik a génexpressziója (**12. és 13. ábra**). Két héttel a kezeléseket követően jelentősen nő az 520 nm-es fluoreszcencia a növények levelében. Ezzel együtt azonban csökken a *C4H* génexpressziója. Érdekesség, hogy fertőzés hatására végig alacsony szinten marad a *CHS* génexpressziója a növények levelében (**14. ábra**).

Egy és két héttel a kezeléseket követően nőtt a növények szárában az összfenoloid-tartalom (**12. ábra**). A *CHS* génexpressziója csekély mértékben emelkedik meg az első héten, majd a levélben tapasztalt alacsony értéket veszi fel.

Montero és mtsai (2016) szőlőt fertőztek *szőlő levélsodródás vírussal*. Fertőzés hatására nőtt a fenilpropanoid bioszintézis útvonal számos termékének a mennyisége (pl. flavonolok), valamint emelkedett az F440 és F520 fluoreszcencia intenzitása is. Munkám során az 520 nm-es fluoreszcenciahozam növekedést nekem is sikerült kimutatnom az MDMV-fertőzés hatására, viszont a 440 nm-es fluoreszcenciahozam csökkent. Ez a különbség az eltérő növényfajokkal és vírusokkal magyarázható, hisz a növények másféle válaszreakciót adnak a különböző fertőzésekre, melynek eredményeképpen eltérő vegyületek halmozódnak fel a növényi részekben. Piñeda és mtsai (2008) dohánynövényeket fertőztek *paprika enyhe tarkulás vírussal*. Megfigyelték, hogy a fertőzés következtében emelkedett a zöld és kék fluoreszcencia hozama. A fluoreszcenciahozamok közül az F520 dominált, ami összhangban van saját megfigyeléseimmel is.

Hasonló eredményt értek el Kofalvi és Nassuth (1995) is. Munkájuk során *búza csíkos mozaik vírussal* fertőzött búzák levelében nőtt a cinnamilalkohol-dehidrogenáz szintje, amiből azt a következtetést vonták le, hogy fokozódott a fenilpropanoid bioszintézis útvonal aktivitása.

Szintén a fenilpropanoid bioszintézis útvonal fokozódását mutatták ki Bellés és mtsai (2008) is. Ők uborkát és dinnyét fertőztek *prunus nekrotikus gyűrűfoltosság* és *sárgadinnye nekrotikus foltosodás vírusokkal*. Eredményeik alapján fokozódott a *C4H* mRNS termelése, mely génnek az aktivitását MDMV-fertőzött kukoricáknál nekem is sikerült igazolnom. Hasonlóan, Legrand és mtsai (1976) TMV-vel fertőzött dohánynövényekben írták le a *C4H* aktivitásának növekedését. Az enzim aktivitásának növekedését nemcsak vírus, hanem gombafertőzés során (*Botrytis cinerea*) is sikerült kimutatni (Maule és Ride 1983).

5.3.2. A fenoloidtartalom változása SMM-kezelés hatására

Az SMM az SMM-ciklus egyik alkotóeleme, mely olyan vegyületek szintéziséhez járul hozzá, amelyek szervesen részt vesznek a fenolszármazékok kialakulásában. Az SMM exogén adagolásával megváltozik a komponensek részaránya az SMM-ciklusban, ami döntően befolyásolja a többi anyagcsere-folyamatot is a növényben, így közvetve hatás gyakorolható a fenilpropanoid bioszintézis útvonalra is. Ennek felderítéséhez *smm* és *smm+mdmv* csoportba tartozó növényeknél is vizsgáltam a fenoloidok mennyiségi és minőségi változását.

Az *smm* növények levelében jelentősen nőtt mind a 440, mind az 520 nm-es fluoreszcencia (**9. táblázat**). Meglepő módon az SMM-kezelés önmagában nem okozott jelentős változást az összfenoloid-tartalomban (**12. ábra**). A növények szárában 1 héttel a kezeléseket követően nő a *C4H* génexpressziója, viszont a többi hét folyamán, illetve a levelekben csökkenés tapasztalható a *kontroll* növényekhez képest (**13. ábra**). A SMM-kezelés jelentősen csökkenti a *CHS* génexpresszióját is (**14. ábra**).

smm+mdmv növényeknél az előkezelés hatására nőtt a 440 és 520 nm-es fluoreszcencia hozama az *mdmv* növényekhez képest (kivételt képez a második héten az 520 nm-es fluoreszcenciahozam), viszont a fotometriás mérés során meghatározott összfenoloid-tartalomban jellemzően csökkenés tapasztalható. Érdekes, hogy a *C4H* génexpressziója jelentősen nő a második és a harmadik héten a növények levelében és a harmadik héten a szárában is, számottevően meghaladva az *mdmv* növények értékét is. Hasonlóan, egy héttel a kezeléseket követően szignifikánsan nő a növények levelében és szárában a *CHS* génexpressziója, és a levélben 2, míg a szárban 3 héttel a kezeléseket követően is jelentős növekedés mérhető.

Hasonló eredményt értek el Kósa és mtsai (2011), akik hidegstressz hatásait vizsgálták kukorica növényeken. Eredményeik alapján az SMM-kezelés nem okozott jelentős változást a

fenoloidtartalomban, viszont amennyiben a kezelést követően hidegstressznek tették ki a növényeket, akkor számottevő növekedést mértek. Megállapították, hogy a kezelés stressz során hozzájárult a védő hatású fenoloidok szintéziséhez, és hasonló tendenciát figyeltem meg én is *smm+mdmv* kukoricáknál. Páldi és mtsai (2014) is megegyező eredményt kaptak. Kutatásuk alapján az SMM-kezelés önmagában kevésbé módosította a *C4H* gén expresszióját, viszont a hidegstressz fokozta azt. Amennyiben SMM-kezelést is kaptak a hidegstressznek kitett kukoricák, akkor tovább nőtt a gén kifejeződése. Hasonlóan nőtt a *CHS* gén expressziója is. Ezzel szemben az SMM-kezelés önmagában csekély mértékben emelte meg a *CHS* génexpresszióját. Eredményeim összevethetők ezen megfigyelésekkel, hisz jelentős emelkedést a gének expressziójában az *smm+mdmv* növényeknél tapasztaltam én is. Ezen megfigyelések alapján megállapítható, hogy az SMM-kezelés önmagában nem fokozza jelentősen a fenilpropanoid bioszintézis útvonal aktivitását. Amennyiben viszont az SMM-előkezelést követően stresszhatás éri a növényeket, akkor a fenilpropanoid bioszintézis útvonalnak még erősebb lesz az aktivitása, mintha csak a stressz (pl. MDMV-fertőzés) érné a növényt, melynek eredményeképpen védő hatású másodlagos anyagcseretermékek keletkeznek és halmozódnak fel a növényekben, hozzájárulva a növény integritásának megőrzéséhez.

5.3.3. Az MMS-kezelés hatása az összfenoloid-tartalomra és a fenilpropanoid bioszintézis útvonalra

Az *mms* és *mms+mdmv* növényeknél fotometriás módszerrel mértem összfenoloid-tartalmat, illetve génexpressziósan vizsgáltam a *C4H* és *CHS* változásait. Hasonlóan, mint az SMM-kezelt növényeknél, a második héten MMS-kezelés hatására csökken az összfenoloid-tartalom a növények levelében, azonban egy héttel a kezeléseket után a növények szárában növekedés tapasztalható (**12. ábra**). A *C4H* génexpressziós változása megegyezik az *smm* növényeknél tapasztaltakkal: csökken a génexpresszió szintje a levelekben, viszont nő a szárban rövidebb idővel a kezelést követően (**13. ábra**). Érdekes, hogy az *mms* csoportban nő a *CHS* génexpressziója 1 héttel a kezeléseket után levelben és szárban egyaránt, míg ez az *smm* növényeknél nem figyelhető meg (**14. ábra**).

Az *mms+mdmv* növényeknél magasabb összfenoloid-tartalom mérhető a második héten a növények szárában, mint az *mdmv* egyedekben. Ez eltér az SMM-kezelt növényeknél megfigyeltektől, így a növekedés vélhetően az SA hatásának tudható be. A *C4H* génexpressziós

változásai megegyeznek az *smm+mdmv* növényeknél tapasztaltakkal: mind levélben, mind szárban számottevő növekedés figyelhető meg a második héttől kezdődően. A *CHS* génexpressziója hasonlóan alakul, mint az *smm+mdmv* növényeknél. Eltérés azonban, hogy a leveleknél a csökkenés hamarabb és nagyobb intenzitással következik be, továbbá, hogy a száракban mért génexpressziós érték a harmadik héten nagyobb növekedést mutat.

Ahhoz, hogy meg lehessen érteni az MMS hatásmechanizmusát, az SMM mellett az SA növényekre gyakorolt hatását is ismerni kell. Campo és mtsai (2003) kimutatták, hogy SA-kezeléssel nő a CHS enzimaktivitása növényekben. Hasonló eredményt értek el Salzman és mtsai (2005) is, akik a *CHS* mellett a *C4H* génexpressziójának a növekedését is igazolták SA-kezelt növényekben. A vegyület *CHS* génexpresszióját fokozó hatását Ghasemzadeh és mtsai (2012) is igazolták gyömbéren. A fenilpropanoid bioszintézis útvonal termékei közül többek között a kvercetin mennyiségének a növekedéséhez járul hozzá az SA (Gondor és mtsai 2016a). Ezen eredmények magyarázatul szolgálnak az MMS hatásainak megértéséhez. Az MMS-kezelés stressz során növekedést okoz a *CHS* és a *C4H* génexpressziójában egyaránt. Az eredmények alapján látható, hogy biotikus stressz során MMS-kezelés hatására nő a növényekben termelődő védő hatású fenoloidok szintézise és felhalmozása, mellyel közvetve fejt ki a vegyület a védő hatását. Összevetve az SMM-mel, jelentősebb növekedést eredményez a fenilpropanoid bioszintézis útvonal génexpresszióját tekintve, ami az SA jótékony hatásának köszönhető.

5.4. Az antioxidáns rendszer és változásai

5.4.1. Vírusfertőzés hatása az antioxidáns tulajdonságokkal rendelkező enzimek aktivitására és kifejeződésére

MDMV-fertőzés során károsodik a növények membránja, melynek következtében reaktív oxigénformák szabadulnak fel. Ezek semlegesítéséhez termelnek a növények antioxidáns tulajdonságokkal rendelkező enzimeket. Hatásmechanizmusuk abban rejlik, hogy reakcióba lépnek reaktív oxigénformákkal és kevésbé káros vegyületté alakítják azokat, illetve segítenek a rendszer redox állapotának szabályozásában. Munkám során 3 fő antioxidáns enzimnek vizsgáltam a változásait: APX, GPX és GR. Az enzimek aktivitása mellett vizsgáltam a szintézisükkel összefüggő gének egyes izoformáinak expressziós változását is. A vizsgálatokhoz a növények leveléből és gyökeréből is vettem mintákat.

5.4.1.1. Az APX enzimaktivitásának és génexpressziójának változása MDMV-fertőzés hatására

Vírusfertőzés során csökken az APX génaktivitása *mdmv* növények levelében a második és a harmadik héten (**15. ábra**). Ezzel együtt noha az első héten csekély mértékben emelkedik az enzim aktivitása ugyanezen növényi részben, a többi vizsgálati időpontban már csökkenés tapasztalható. A növények gyökerében emelkedik mind az enzimaktivitás, mind a génexpresszió egy héttel a kezeléseket követően, majd a levelekben megfigyeltekhez hasonlóan csökkenés figyelhető meg a génexpressziós adatokban (**16. ábra**).

Hasonló eredményt értek el Mittler és mtsai (1998), akik TMV-vel fertőzött dohánynövényekben vizsgálták a citoszólikus APX aktivitását. Az enzim magas szintje elengedhetetlen a sejthalál kiváltásához, mellyel a növény védekezik a vírusfertőzéssel szemben. Fodor és mtsai (1997) szintén dohánynövényben vizsgálták a TMV-fertőzés hatását és ők is kimutatták az enzimaktivitás csökkenését. Az enzim viaszorításával csökken azon vegyületek száma, melyek hatékonyan kioltják a reaktív oxigénformákat, és ezáltal nő a membránsérülések és lipidperoxidáció mértéke, ezzel fokozódik a sejtelhalás a fertőzött területen. Az APX enzim génexpressziójának és aktivitásának csökkenésével megnő *mdmv* növények levelében a reaktív oxigénformák száma, így károsodnak a fotokémiai rendszerek (**8., 9., 10. és 11. ábra**). A növény pusztulásának elkerülése végett, az enzimaktivitás csökkenését ellensúlyozandó, emelkedik a védelemben szerepet játszó fenoloidszarmazékok mennyisége (**9. táblázat, 12., 13. és 14. ábra**).

5.4.1.2. A GR kifejeződésének és aktivitásának változásai fertőzés hatására

A GR aktivitása hasonlóan változik az APX-nél megfigyeltekkel. Egy héttel a kezeléseket után nő az enzim aktivitása és génjének a kifejeződése is az *mdmv* növények levelében, viszont két és három héttel a fertőzés után már csökkenés figyelhető meg a génexpressziós adatokban (**17. ábra**). A növények gyökerében aktív génexpresszió látható 1 héttel a kezeléseket után, viszont az enzim aktivitása nem változik jelentősen a *kontroll*hoz képest, ami arra utal, hogy a *GR1* izoforma génkifejeződése aktívabb volt a többi izoformánál (**18. ábra**).

Hasonló eredményt értek el Clarke és mtsai (2002), akik *fehérhere mozaik vírussal* fertőzött veteménybabban kimutatták a GR enzimaktivitásának a csökkenését. A növényekben nem alakult ki hiperszenzitív reakció, viszont az antioxidáns enzim viaszorításával hatékonyabban tudott fertőzni és szaporodni a *fehérhere mozaik vírus* a veteménybabban. *Csomós ebír foltosság vírussal* fertőzött csomós ebír növényekben szintén csökkent a GR

antioxidáns enzimek aktivitása a fertőzés korai szakaszában (Li és mtsai 2003). A kutatók megfigyelték azonban, hogy a vírusnak ellenállóbb növényekben enyhén emelkedik az enzim aktivitása, ami szerepet játszhat a rezisztencia kialakításában. Kukoricanövényeknél is hasonló mechanizmus figyelhető meg MDMV-fertőzés során, hisz hasonlóan az APX enzimhez, a GR enzim kifejeződése és aktivitása is visszaszorul a fertőzés során.

5.4.1.3. A GPX enzimaktivitásának és génexpressziójának változásai MDMV-fertőzés során

Nagyobb változás volt megfigyelhető *mdmv* növényekben a GPX esetében. Egy héttel a vírusfertőzés után jelentősen nő az enzim aktivitása a növények levelében, és ezzel együtt fokozódik a génexpresszió is (**19. ábra**). Az enzim aktivitása 3 héttel a kezelések után is emelkedik, eltérően a többi vizsgált enzimtől, viszont génexpressziós szinten csökkenés tapasztalható *kontroll* növényekhez képest, ami jelzi, hogy a *ZmPRX70* izoforma jelentősen veszít kifejeződéséből a többi *GPX* izoformához képest. A növények gyökerében pont fordítva alakul az enzim aktivitásbeli változása. Amíg az első és a harmadik héten nem tér el a *kontrolltól*, addig a második héten szignifikánsan meghaladja azt. Ezzel ellentétesen változik a génexpressziós mintázat, miszerint 1 és 3 héttel a kezelések után mérhető jelentős növekedés, azonban a második héten, amikor az enzim aktivitása magas, akkor alacsony a *ZmPRX70* izoforma génexpressziója.

Riedle-Bauer (2000) szoros összefüggést írt le a peroxidázok aktivitása és a vírus szövetbeli lokalizációja között. A vírusfertőzés során termelődő reaktív oxigénformák semlegesítésében játszik fontos szerepet az enzim, de emellett H_2O_2 -molekulák képződését is generálja, melyek a vírusfertőzés során fellépő levélsárgulás vagy mozaikos mintázat kialakulásáért felelősek. Emellett a törpenövés kialakulásában is lehet szerepük. A GPX esetében nekem is sikerült emelkedést kimutatnom az enzimaktivásban és génjének kifejeződésében, illetve fluktuáció is megfigyelhető a hetek folyamán, mely ellentétes a levelek és a gyökérzet között. Az MDMV a levelekbe jutást követően a szállítónyalábokon a növény gyökerébe kerül, ott szaporodik, majd visszatér a levélbe, és így vándorol a növényi részek között, míg el nem terjed az egész egyedben. Ezzel a vándorlással összhangban változik a GPX kifejeződése is, így a magas enzimaktivitás a vírus jelenlétével magyarázható. Ezáltal, a vírusfertőzés során felhalmozódó reaktív oxigénformák semlegesítésében elsősorban a GPX-nek lehet szerepe a vizsgált antioxidáns enzimek közül, továbbá a fenoloidszármazékok felhalmozódása is hozzájárul a védelemhez.

5.4.2. Az SMM-kezelés hatása az antioxidáns enzimekre

Az SMM, amellett, hogy fontos metildonor, jelentős szerepet játszik a kénanyagcsere szabályozásában is. Kiinduló vegyülete számos védő hatású és antioxidáns tulajdonságú vegyületnek, pl. a GSH-nak. Éppen ezért fontos vizsgálni, hogy a vegyület exogén adagolásával hogyan módosul az enzimek kifejeződése és expressziója.

5.4.2.1. Az SMM-kezelés hatása az APX génexpressziós és enzimkinetikai változására

smm növények levelében nem változott szignifikánsan az APX aktivitása a *kontroll* növényekhez képest, viszont két és három héttel a kezeléseket követően jelentősen csökkent a génkifejeződés mértéke (**15. ábra**). Nincs jelentős változás az enzimaktivitás adatokban a gyökér régióban sem, azonban az első és a második héten szignifikáns csökkenés figyelhető meg. Ezzel szemben markánsan csökken a génaktivitás a második és a harmadik héten az *smm* növények gyökerében, ami a *ZmAPX1.2* izoforma expressziós változásával magyarázható (**16. ábra**). Az eredmények alapján látható, hogy az SMM-kezelés hatására csökken mind levél, mind gyökér szinten az enzim kifejeződése.

Egy héttel a kezeléseket követően az *smm+mdmv* növények levelében jelentősen nő az enzim aktivitása és génkifejeződése is, szignifikánsan meghaladva az *mdmv* növények értékét is (**15. ábra**). A kutatás további heteiben csökken a *ZmAPX1.2* izoforma génkifejeződése a *kontroll*hoz képest, viszont meghaladja az *smm* és az *mdmv* növények értékét, azonban különbség az APX enzimaktivitás adatokban már nem látható. *smm+mdmv* növények gyökerében egy héttel a kezeléseket követően szintén kimagasló az APX génkifejeződése, ami magas enzimaktivitási értékkel is párosul. Viszont amíg az első héten a génexpressziós eredmények alapján az *smm+mdmv* növények gyökerében a *ZmAPX1.2* kifejeződése meghaladja az *mdmv* növényekben mérhető értéket, addig az enzimaktivitás adatok nem különböznek a két csoportban. A második és a harmadik héten már nincs jelentős különbség az *mdmv* és az *smm+mdmv* növények gyökérben mért génexpressziós értékeik között. Az eredmények fényében elmondható, hogy az SMM-előkezelés hatására röviddel a fertőzést követően jelentősen nő az enzimaktivitás és a génexpresszió is a növények levelében és gyökerében egyaránt, így a növény hatékonyabban tudja semlegesíteni a fertőzés következtében megjelenő reaktív oxigénformákat.

Hasonló eredményt kaptak Kósa és mtsai (2009), akik hidegstressznek kitett kukorica növényeket kezeltek SMM-mel és emelkedést tapasztaltak az APX enzimaktivitásában a kettős

kezelés hatására. Hasonló változást Rudnóy és mtsai (2015) is kimutattak, akik szintén kukorica növényeket kezeltek SMM-mel és esetükben is emelkedett az APX enzimaktivitása.

5.4.2.2. A GR génexpressziós és aktivitásbeli változásai SMM-kezelés hatására

Az APX-től eltérően változott a GR enzimaktivitása és génjének kifejeződése is. A levelekben 1 héttel a kezelések után nőtt az enzimaktivitás, azonban szignifikánsan már nem tért el a *kontroll* növényektől a második és harmadik héten (**17. ábra**). Ezzel együtt a *GRI* izoforma génkifejeződése végig alacsonyan maradt. A gyökerekben az enzimaktivitás a harmadik héten éri el a maximumát, jelentősen meghaladva a *kontroll* növények értékét, azonban ezzel ellentmondásosan a génexpresszióban nem figyelhető meg emelkedés (**18. ábra**). Ez jelzi, hogy a gyökérben vélhetően nem termelődött több *GRI* izoforma, hanem a többi izoforma aktivitása fokozódott.

Fertőzés hatására tovább fokozódik az SMM-előkezelt növények levelében a *GRI* izoforma génexpressziója az első hét folyamán, viszont az enzimaktivitás nem haladja meg az *mdmv* növények értékét. A második és a harmadik hét során végig magasabb szinten marad az *smm+mdmv* növények levelében a gén kifejeződése, mint az *mdmv* növényekben, és ezzel együtt az aktivitás is növekszik a harmadik héten (**17. ábra**). A génkifejeződés növekedését a gyökérben is sikerült kimutatni az *smm+mdmv* csoportban az első héten, hasonlóan az *mdmv* növényekhez, viszont itt fokozatos csökkenés tapasztalható, és a harmadik héten már szignifikánsan az *mdmv* növényekben mért érték alatt van a génkifejeződés (**18. ábra**). Ezzel ellentétesen a kísérlet korai szakaszában nő a gyökerekben az enzim aktivitása *mdmv*hez képest, majd a második héten jelentősen csökken, viszont a harmadik héten szignifikánsan meghaladja az *mdmv* növényekben mérhető értéket. Az eredményeim egybevágnak Kósa és mtsai (2009) megfigyeléseivel, így levonható a következtetés, hogy a vegyület stressz során fokozza az antioxidáns rendszer aktivitását, ezzel védve a növényt a károsodástól.

5.4.2.3. Változások a GPX aktivitásában és kifejeződésében SMM-kezelés hatására

Az SMM-kezelés rövidtávon fokozza a *ZmPRX70* izoforma génexpresszióját a növények levelében, viszont ez az aktivitásbeli adatokban nem mutatkozik meg (**19. ábra**). A vegyület csökkenti a gén kifejeződését a növények gyökerében, viszont hosszabb távon (3 héttel a kezelések után) jelentősen növeli az enzimaktivitást (**20. ábra**).

Vírusfertőzés során jelentősen csökken az SMM-előkezelt növények levelében a GPX enzimaktivitása az *mdmv* növényekhez képest, azonban, számottevő mértékben fokozódik a *ZmPRX70* izoforma génexpressziója (**19. ábra**). Az *smm+mdmv* növények gyökerében szintén csökken az enzim aktivitása egy héttel a kezelések után, viszont a továbbiakban már nem tér el szignifikánsan az *mdmv*-től (**20. ábra**). A fertőzés korai szakaszában emelkedik a gén expressziója az *smm+mdmv* növények gyökerében, majd a hetek folyamán csökkenést mutat. Az eredmények arra engednek következtetni, hogy a vegyület csekély mértékben fokozza az enzim kifejeződését és aktivitását, és vírusfertőzés során se okoz hosszú távon növekedést benne. Kósa és mtsai (2009) SMM-előkezelt hidegstressznek kitett növényekben hosszabb távon növekedést mértek a GPX aktivitásában. A különbséget magyarázhatja, hogy eltérő növényfajtát használtak kísérleteik során, továbbá, hogy más típusú stressz érte a növényeket.

5.4.2.4. Az SMM-kezelés hatásainak összefoglalása

Összefoglalásként elmondható, hogy az SMM-kezelés nem okoz jelentős emelkedést egyik mért antioxidáns enzim génaktivitásában sem, inkább csökkenés figyelhető meg. A növények gyökerében csekély mértékben nőtt a GPX és a GR enzimaktivitása 3 héttel a kezeléseket követően. Ezzel szemben, amennyiben a kezelést követően stressz éri a növényeket, akkor az *mdmv* csoportban tapasztalt enzimaktivitás vagy génexpressziós növekedés többszörösét mutatja a növény, ami jelzi, hogy a vegyület hatására hatékonyabb antioxidáns védekezés valósul meg.

5.4.3. Az MMS-kezelés hatása az antioxidáns enzimekre

5.4.3.1. Változások az APX aktivitásában és génkifejeződésében MMS-kezelés hatására

Az MMS-kezelés rövid távon jelentősen növeli az APX enzimaktivitását a növények levelében (**15. ábra**). Két héttel a kezelések után már csökken az enzimaktivitás és ezzel együtt a vizsgált izoforma génexpressziója is.

Fertőzést követően az MMS-előkezelés rövid távon jelentős génexpressziós növekedést eredményezett a növények levelében és gyökerében egyaránt (**15. és 16. ábra**). Két és három héttel a kezelések után is még magasabb az *mms+mdmv* növények génexpressziója, mint az *mdmv* növényekben. Ezzel ellentétesen változik az enzimaktivitás: az *mms+mdmv* növények értéke elmarad az *mdmv* értékétől.

Gondor és mtsai (2016a) 0,5 mM SA-val kezeltek búza növényeket és vizsgálták az APX aktivitásának a változását levélben és gyökérben egyaránt. Eredményeik alapján a kezelést követő egy hétben jelentősen nőtt a növények levelében és gyökerében az enzim aktivitása, melyet az SA H₂O₂ képződést előidéző hatásával magyaráztak, így jelenléte enyhe oxidatív stresszt jelent a növénynek. Hasonló eredményt értek el Shi és mtsai (2006), akik SA-val kezeltek elő növényeket, melyeket a későbbiekben hőstressznek tettek ki. A kettős kezelésnek kitett növényeknél nőtt az APX aktivitása, amihez hasonlóan nekem is sikerült kimutatnom röviddel a kezeléseket követően. Kimutatták továbbá, hogy stresszmentes körülmények között csökken az APX enzimaktivitása SA-kezelés hatására. Munkám során az MMS-kezelés rövid távon fokozta az enzim aktivitását, viszont hosszabb távon már itt is csökkenést tapasztaltam. Az SA APX enzimaktivitás csökkentő hatását igazolták többek között Durner és Klessig (1995), Fodor és mtsai (1997) és Rao és mtsai (1997) is.

Eltérő eredményt értek el Kang és Saltveit (2002), akik 0,5 mM koncentrációban adtak SA-t kukoricához, majd hidegstressznek tették ki őket. Eredményeik alapján a kezelések nem okoztak szignifikáns változást az APX aktivitásában. Az eredmények alapján feltételezhető, hogy az SA magas koncentrációban alkalmazva negatívan hat az enzim aktivitására, míg kisebb koncentrációban nincs hatása. A különböző eredményekhez hozzájárul a tény, hogy más növényfajokat használtak a kísérletek során. Kang és Saltveit (2002) ugyanúgy 0,5 mM koncentrációban használták az SA-t, mint amilyen koncentrációban az MMS-t kapták a növények, azonban kísérleteik során Golden Jubilee növényfajtát használtak, ami okozhatja az eltérő eredményt.

5.4.3.2. Az MMS-kezelés hatása a GR kifejeződésére és aktivitására

mms növények levelében jelentősen nő az enzim aktivitása 1 héttel a kezelések után, viszont a további hetek során nem tér már el a *kontroll* értékétől, azonban a *GRI* izoforma génexpressziós adataiban csökkenés következik be (**17. ábra**). Az *mms+mdmv* növényeknél jelentősen nő az enzim génjének expressziója egy héttel a kezelések után. Ugyanezen a héten szignifikánsan nő az enzimaktivitás is, viszont ez elmarad az *mdmv* növények értékétől. Két és három héttel a kezelések után az *mms+mdmv* növényeknél mérhető a legalacsonyabb enzimaktivitási érték, viszont a *GRI* izoforma génexpressziós adatai meghaladják az *mdmv* növény értékét.

Az *mms* növények gyökerében 1 héttel a kezelések után hasonló változás figyelhető meg, mint a leveleknél, továbbá a génexpressziós aktivitás is nő (**18. ábra**). A második és a harmadik héten a gyökerekben is csökken az enzim génjének a kifejeződése és az enzim aktivitása is. Egy héttel a kezelések után az *mms+mdmv* növények gyökerében alacsonyabb enzimaktivitás mérhető, mint az *mdmv*-nél, azonban génexpressziós szinten meghaladja az *mdmv* csoport értékét. Két héttel a kezelések után nő az enzimaktivitás az *mdmv* növényekhez képest, viszont nincs különbség a vizsgált izoforma génexpressziós adataiban. A kezelés harmadik hetében az *mms+mdmv* növények génexpressziós értékei szignifikánsan alacsonyabbak az *mdmv* növényekben mért értéktől.

A GR aktivitásának a növekedését Clarke és mtsai (2002) is igazolták SA kezelést követően. Vizsgálataik során *fehérhere mozaik vírussal* fertőzött veteménybab növényeknél a fertőzés mellett vizsgálták az SA hatásait is, és különböző mértékben, de növekedést tapasztaltak. Szintén növekedést kaptak Shi és mtsai (2006) a GR enzim aktivitásában, amennyiben SA-val kezelt és hőstressznek kitett uborkákat vizsgáltak. Szalai és mtsai (2005) kukorica növényeken vizsgálták a SA-kezelés és hideg-, valamint kadmiumstressz hatását. Eredményeik alapján nőtt a GR enzimaktivitása az SA hatására, viszont hideg-, továbbá kadmiumstressz hiányában rövid ideig volt magas szinten, majd csökkent. Eredményeim alapján röviddel a kezeléseket követően jelentősen emelkedik a GR kifejeződése és aktivitása *mms* vagy *mms+mdmv* növényeknél. A génkifejeződés mértéke az *mms+mdmv* növényeknél szignifikánsan meghaladja az *mdmv* növényeknél mért értéket, ami jelzi, hogy rövid távon a vegyület fokozza a növényi antioxidáns rendszer aktivitását.

5.4.3.3. Az MMS-kezelés hatása a GPX aktivitásbeli és génexpressziós változására

Az MMS-kezelés a 2. és 3. héten csökkenti az enzim aktivitását a növények levelében (**19. ábra**). Ugyanez a csökkenés a génexpressziós adatoknál is megfigyelhető, viszont az 1. héten nő a *ZmPRX70* izoforma génkifejeződése az *mms* növények levelében. *mms+mdmv* növények levelében az első héten magasabb az enzimaktivitás, mint a *kontroll* és *mms* növényeknél, viszont elmarad az *mdmv* növények értékétől. A második és a harmadik héten tovább csökken az enzimaktivitás, és a harmadik héten már szignifikánsan az *mdmv* növények értéke alatt van. Ezzel ellentétesen változik az izoforma génexpressziója. Az első és a harmadik

héten jelentősen az *mdmv* növényekben mért érték fölött van az *mms+mdmv* növények értéke, míg a második héten csak csekély mértékben tér el tőle.

A növények gyökerében eltérően alakul az enzim aktivitása és kifejeződése. Az első héten szignifikánsan nő az *mms* növényekben az enzimaktivitás, és ezzel együtt magas szinten van a gén expressziója is (**20. ábra**). A kísérlet második hetében az MMS-kezelés nem okoz jelentős változást az enzimaktivitási adatokban, majd a harmadik héten csökken, viszont jelentősen csökken a *ZmPRX70* izoforma génkifejeződése a növények gyökerében. *mms+mdmv* növényekben amíg az első héten szignifikánsan magasabb az enzimaktivitás az *mdmv*-hez képest, addig az izoforma génexpressziós adatai elmaradnak tőle. A második és a harmadik héten jelentősen alacsonyabb az enzimaktivitása az *mms+mdmv* növényeknek az *mdmv*-hez képest, és ez megfigyelhető a harmadik héten a génexpressziós adatokban is.

Simaei és mtsai (2011) szójában vizsgálták az SA és egy növényt károsító vegyület, az SNP (nátrium-nitroprusszid) hatásait az antioxidáns rendszer aktivitására. Eredményeik szerint SNP-kezelés során csökkent a GPX aktivitása, melynek eredményeképpen oxidatív stressz érte a növényeket. Ezt a hatást mérsékelni lehetett SA hozzáadásával, mivel a vegyület emeli a GPX aktivitását, ezáltal hatékonyabban oltja ki a reaktív oxigénformákat. Kísérleteim során a növények levelében sikerült növekedést kimutatnom a *GPX* génexpressziójában *mms+mdmv* növényekben, viszont a gyökér régióban csökkenést tapasztaltam. Vírusfertőzés során a legtöbb károsodás a növények levelét éri, továbbá a fotokémiai rendszerek károsodása is elsősorban ott fejti ki a hatását. Három héttel a kezeléseket után nő az *mms+mdmv* növények levelében a génexpresszió, ami jelzi, hogy a vegyület hatására fokozódik az antioxidáns tulajdonságú enzim kifejeződése. A GPX enzimaktivitása csökken ugyanezen a héten, viszont az ELISA és qRT-PCR adatok alapján (**4. ábra**) a vírus mennyisége is jelentősen esik az *mdmv* növényekhez képest, és ugyanez figyelhető meg a gyökérben is. Ez a megfigyelés alátámasztja, miért nem nő meg az antioxidáns hatású enzim aktivitása ebben az időszakban.

5.4.3.4. Az MMS-kezelés hatásainak az összefoglalása

Az MMS-kezelés az 1. héten emeli az antioxidáns rendszerek aktivitását és kifejeződését, ami jelzi, hogy a kezelés enyhe stresszt jelent a növénynek, melyre fokozottabb védekezéssel válaszol. *mms+mdmv* növényekben az előkezelés hatására fokozódik az APX, GR és a

levelekben a GPX kifejeződése, így több védő hatású enzim termelődik a növényekben, melynek eredményeképpen hatékonyabb védekezés válik lehetővé.

5.5. Az MDMV-fertőzés során aktiválódó növényi gének expressziós változásai

5.5.1. A *GF14-6* génexpressziós változásai

A 14-3-3 családba tartozó fehérjék növényekben fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításában játszanak szerepet, mely által szignáltranszdukciós útvonalakat szabályoznak (így hatva a metabolizmusra, hormonokra, fényszignalizációra, transzkripcióra, sejtciklust szabályozzák, illetve a növényi stresszválaszokat alakítják). A 14-3-3 fehérjék többek között APX-hez is képesek kötődni, így járulva hozzá az oxidatív stressz szabályozásához (Chen és mtsai 2006). Számos tanulmány igazolta, hogy a 14-3-3 fehérjék fontos szerepet játszanak a növényi védelemben. Paradicsomban a 14-3-3 fehérjék pozitívan szabályozzák az R-fehérje mediált rezisztenciát és a programozott sejthalált (Lozano-Durán és Robatzek 2015). Kukoricában nőtt a *ZmGF14-6* génexpressziója gombafertőzés és sóstressz hatására, viszont ezzel ellentétesen változott szárazságstresszelt növényeknél. Transzgénikus rizsben a *ZmGF14-6* génterméke fokozza a növények érzékenységet számos gombafertőzés során. Ezek a megfigyelések igazolják, hogy a 14-3-3 fehérjecsalád tagjai bonyolult szabályozási hálózatban vesznek részt, és több szinten szabályozzák a növény válaszreakcióját stresszhelyzetben (Campo és mtsai 2012).

5.5.1.1. A *GF14-6* génexpressziós változásai vírusfertőzés során

mdmv növényekben csökken a *GF14-6* génexpressziója a fertőzést követő hetekben (**21a és b ábra**). Amíg az első héten a *kontroll*al megegyező a génexpresszió, addig már a második és a harmadik héten jelentősen csökken. Az eredmények alapján a vírus blokkolhatja a gén expresszióját, ezzel szorítva vissza a növény védekezését, de az sem zárható ki, hogy a *GF14-6* transzkripciós faktorként, vagy ahhoz hasonlóan működve viszonylag hamar betölti funkcióját a fertőzésre adott válasz létrejöttében és később már veszít aktivitásából. Uzarowska és mtsai (2009) enyhe növekedést mutattak ki a *GF14-6* expressziója esetében, viszont ők SCMV-fertőzött növényeknél vizsgálták a génexpressziós változásokat. Noha az MDMV közeli rokona az SCMV-nek, a tapasztalt eltérést lehet a különböző vírusokkal magyarázni. Továbbá Uzarowska és mtsai (2009) nem hosszabb időn keresztül, hanem csak egyszer vettek mintát a

fertőzött növényekről, így fennáll a lehetősége, amennyiben ők is több héten keresztül vizsgálták volna a fertőzés hatásait, más eredményt kaptak volna. Érdekesség, hogy a *GF14-6* génexpressziója fertőzött növények levelében hasonló változást mutat az *APX* vizsgált izoformájának génexpressziós változásaival (**15. ábra**). Az antioxidáns enzim és a *GF14-6* kapcsolatát korábban is leírták (Chen és mtsai 2006).

5.5.1.2. Az SMM-kezelés hatása a *GF14-6* expressziójára

Rövid távon az SMM-kezelés nem okoz jelentős változást a *GF14-6* génexpressziójában, viszont három héttel a kezelések után már jelentősen csökkenti azt (**21a ábra**). Ezzel ellentétesen alakul az *smm+mdmv* növények értéke. A fertőzés korai szakaszában, már egy héttel a kezeléseket követően szignifikánsan nő a *GF14-6* kifejeződése. Az eredmények alapján látható, hogy a vegyület serkenti a gén kifejeződését, mely ezáltal a növényi védekezésben jelentős útvonalakat aktiválhat. Ezen útvonalak, feltehetően az antioxidáns rendszer és a fenilpropanoid anyagcsere aktiválása révén nagyban javítják a növény válaszreakcióját a vírushatással szemben, és közvetve hozzájárulnak a tapasztalt vírusszámcsökkenéshez. A második héten még mindig magas az *smm+mdmv* növényekben a gén expressziója, majd a harmadik héten csökken le jelentősen. Érdekes, hogy az antioxidáns enzimek közül a *GF14-6* génexpressziós változásai a *GPX* izoforma génexpressziós változásaihoz állnak közel (**19. ábra**), így kapcsolat lehet a két rendszer között.

5.5.1.3. Az MMS-kezelés hatása a *GF14-6* expressziós változására

Ellentétben az SMM-mel, *mms* növényekben már egy héttel a kezelés után jelentősen emelkedik a gén kifejeződése (**21b ábra**). Az eredmények alapján a vegyület, vélhetően az SA komponens hatására fokozza a *GF14-6* génexpresszióját, melyen keresztül szabályozza a növényi anyagcsere számos komponensét. Változatosan alakul az *mms+mdmv* növények génexpressziós mintázata. Amíg az első és a harmadik héten jelentős növekedés figyelhető meg, addig a második héten csökkenés tapasztalható. Ez a fluktuáció sejteti, hogy bonyolult szabályozási rendszer áll a génkifejeződés mögött, és az MMS hatása erre a rendszerre sok kérdést fölvet. Hasonló védelmet fejt ki, mint az SMM-kezelés, azonban a fluktuációnak köszönhetően a harmadik héten is erős a gén expressziója, ami jelzi, hogy erősebb és hatékonyabb védelmet fejthet ki a vegyület. Ezt igazolja, hogy számos, jelen értekezésben vizsgált paraméternél jobban teljesítettek az *mms+mdmv*, mint az *smm+mdmv* növények, továbbá, hogy az *mms+mdmv* növényeknél jobban

csökkent a vírus száma is. Hasonlóan, mint SMM-kezelés hatására, MMS-kezelt csoportoknál is párhuzam vonható a *GF14-6* génexpressziós változásai és a *GPX* izoforma génexpressziója között (**19. ábra**).

5.5.2. A *SAMS* génexpressziós változásai

A *SAMS* a SAM szintézisében játszik fontos szerepet, ami nukleinsavak, lipidek és fehérjék metilációjához, továbbá védő hatású hormonok és vegyületek szintéziséhez járul hozzá. Uzarowska és mtsai (2009) igazolták, hogy MDMV-fertőzés során fokozódik a *SAMS* kifejeződése, mely a növény válaszreakciója a fertőzésre. Az enzim kifejeződésének növekedésével több SAM termelődik a növényekben, aminek köszönhetően vélhetően nő a védő hatású vegyületek mennyisége és a szabályozó jellegű metilációs események gyakorisága.

5.5.2.1. A vírusfertőzés hatása a *SAMS* génexpressziójára

Eredményeim alapján a vírusfertőzés korai szakaszában nő a *SAMS* kifejeződése *mdmv* növények levelében (**21c** és **d ábra**). A második és a harmadik hétre azonban szignifikánsan csökken a génkifejeződés. Az SMM-ciklus korán, már egy héttel a vírusfertőzést követően aktiválódik, melynek eredményeképpen nő számos antioxidáns enzim aktivitása és kifejeződése és változik a fenoloidbioszintézis-út vonal aktivitása is. Hasonlóan alakul a *GR* és *GPX* izoformák génexpressziója is, így elképzelhető, hogy szabályozási kapcsolat van köztük (**17.** és **19. ábrák**).

5.5.2.2. Az SMM-kezelés hatása a *SAMS* génexpressziójára

Az SMM szerves részét képezi az SMM-ciklusnak, így mennyiségének exogén módon történő növelésével változik az SMM-ciklus. Meglepő módon azonban sem egy, sem két héttel a kezelés után nem tapasztaltam változást a *SAMS* génexpressziójában *smm* növényekben a kontrollhoz képest (**21c ábra**). A harmadik héten már jelentősen csökken az enzim génjének a kifejeződése, ami arra utalhat, hogy az SMM mennyiségének a növelésével csökkent az SMM-ciklus intenzitása, és kevesebb SAM termelődött a növényekben.

smm+mdmv növényekben mind a három hét során kiemelkedően magasabb génexpresszió mérhető, mint a többi kezelési csoportnál. A kettős kezelés hatására fokozódik az enzim kifejeződése, így vélhetően aktivitása is, melynek eredményeképpen több SAM termelődik a növényekben. Ennek eredményeképpen fokozódnak a metilációs útvonalak, és ezáltal fokozottabb védekezés válik lehetővé vírusfertőzés során. Az antioxidáns enzimek közül a *GPX*

izoforma aktivitásának a változása áll legközelebb a *SAMS* génexpressziós változásához (**19. ábra**).

5.5.2.3. Az MMS-kezelés hatása a *SAMS* génexpressziós változására

Eltérően alakul az *mms* növények génexpressziója az *smm*-től. *mms* növényeknél már a kezelést követő első héten csökken a génkifejeződés mértéke, és végig alacsony szinten marad (**21d ábra**). Az MMS már korábban kifejti a gátló hatását az SMM-ciklusra, vélhetően az SA komponensnek köszönhetően.

mms+mdmv növényekben végig magasabb a *SAMS* génexpressziója az *mdmv* növények értékénél. Az első és a harmadik héten az *mms+mdmv* növények értéke szignifikánsan meghaladja a *kontroll* növények értékét is. A génexpresszió emelkedése nem olyan kifejezett, mint az *smm+mdmv* növényeknél, ami az SMM és SA együttes hatásának vélhető. Az *mms+mdmv* növényekben a *SAMS* változása a *GPX* izoforma génexpressziós változásaihoz áll legközelebb, így vélhetően jelentős szerepe van az antioxidáns enzim génjének a szabályozásában (**19. ábra**).

5.6. MDMV-fertőzés, továbbá az SMM- és MMS-kezelés hatásainak összefoglalása

Doktori munkám során számos élettani és molekuláris szintű vizsgálattal igazoltam az SMM- és az MMS-kezelések védő hatását MDMV-fertőzött kukoricában (Ludmerszki és mtsai 2011, 2014a, 2014b, 2014c, 2015, 2017). Emellett a vírusfertőzés számos olyan hatását is kimutattam, mely új ismeretként bővíti az MDMV hatásának irodalmát.

MDMV-fertőzés hatása:

- ☞ Különböző kukoricavonalak eltérően reagálnak a vírusfertőzésre, amíg Jubilee növényeknél csökken a klorofilltartalom, addig Honey-nál nincs szignifikáns csökkenés.
- ☞ Vírusfertőzött növényekben a vírus blokkolhatja a *GF14-6* expresszióját, ezzel szorítva vissza a növény védekezését, de az sem zárható ki, hogy a GF14-6 transzkripciós faktorként, vagy ahhoz hasonlóan működve viszonylag hamar betölti funkcióját a fertőzésre adott válasz létrejöttében, és később már veszít aktivitásából. Az eredményeim ellentmondanak a szakirodalomban megfigyelttel, ami magyarázható az eltérő kísérleti beállításokkal.

- ☞ Fertőzés hatására 1 héttel a kezelést követően nő a *SAMS* kifejeződése, majd csökken. Ezt követően rövid távon nő a levelekben a *C4H* génnek az expressziója, azonban a *CHS* aktivitása hosszú távon jelentősen csökken.
- ☞ Röviddel a fertőzést követően csökken a 440 nm-es fluoreszcencia értékkel rendelkező fenoloidszármazékok mennyisége, viszont nő az összfenoloid-tartalom a növények levelében és szárában egyaránt.
- ☞ MDMV-fertőzött növényekben 1 héttel a kezelések után nő az APX aktivitása, azonban 2 és 3 héttel később már jelentősen csökken, aminek eredményeképpen nő a reaktív oxigénformák száma, így károsodás lép fel.
- ☞ A GR aktivitása hasonlóan változik az APX-hoz képest, a korai növekedést csökkenés követi, ami a vírusfertőzésnek a következménye.
- ☞ A GPX a másik két antioxidáns enzimmel ellentétben magas aktivitás mutat. Az enzim a vírusfertőzés során termelődő reaktív oxigénformák semlegesítésében játszik fontos szerepet, de emellett H_2O_2 -molekulák képződését is generálja, melyek a vírusfertőzés során fellépő levélsárgulás vagy mozaikos mintázat kialakulásáért felelősek. Emellett a törpenövés kialakulásában is lehet szerepe. A mérések során tapasztalt fluktuáció azzal magyarázható, hogy az MDMV a levelekbe jutást követően a szállítónyalábokon a gyökérbe kerül, ott szaporodik, majd visszatér a levélbe, és így vándorol a növényi részek között, míg el nem terjed az egész egyedben.
- ☞ A *C4H* aktiválódása hozzájárul, hogy a fertőzés későbbi szakaszában jelentősen nő az 520 nm-es fluoreszcencia a növények levelében.
- ☞ A vírus terjedésének köszönhetően nő a ΔpH -függő kioltás és fokozódnak fluoreszcencia és hődisszipációs útvonalak, amik feltételezhetően a Benson-Calvin ciklus sérülésének az eredményei.
- ☞ A fertőzés során kapcsolat alakulhat ki az MDMV-köpenyfehérje és a tilakoidmembránok között, aminek eredményeképpen csökken a PS II reakciócentrumok hatékonysága és erősödnek a fluoreszcencia és hődisszipációs útvonalak.

Az SMM-kezelés hatása vírusfertőzés során:

- ☞ Az SMM-kezelés membránvédő hatásának köszönhetően nő a klorofilltartalom Jubilee kukoricákban, és mérséklődik a fertőzés következtében tapasztalt klorofilltartalom-csökkenés is.

- ⌘ Ellentétben az előkezelés nélküli MDMV-fertőzéssel, SMM-előkezelés hatására jelentősen nő a *GF14-6* és a *SAMS* génexpressziója, aminek eredményeképpen fokozódik a növényi stresszvédelemben szerepet játszó metilációs útvonalak aktivitása, és ezáltal nő védő hatású anyagok képződése.
- ⌘ Az anyagcsere-útvonalak aktiválásának köszönhetően nő a *C4H* és a *CHS* génexpressziója és nő azon vegyületek mennyisége, amik a 440 és az 520 nm-es fluoreszcencia-tartományban bocsájtanak ki fluoreszcenciát.
- ⌘ Az SMM-előkezelés hatására röviddel a fertőzést követően jelentősen nő az APX és a GR enzimaktivitása és génexpressziója, így a növény hatékonyabban tudja semlegesíteni a fertőzés következtében megjelenő oxigénformákat.
- ⌘ SMM-kezelés hatására fokozódik a *GPX* génexpressziója vírusfertőzött növényekben, majd csökkenés figyelhető meg. Ez ellentétben áll az *mdmv* növényeknél megfigyelttel, ahol jelentős *GPX*-aktivitás mérhető, viszont alacsony az izoforma génexpressziója. Kapcsolat lehet a *GF14-6* és a *SAMS* génexpressziós változásával.
- ⌘ A kezelés enyhe stresszt jelent a növénynek, mivel fokozza a Δ pH-függő kioltást, enyhe fotoinhibíciót vált ki és csökkenti az aktív PS II reakciócentrumok számát, azonban vírusfertőzés során ez a károsodás nem figyelhető meg.
- ⌘ Az előkezelésnek köszönhetően vírusfertőzött növényekben kedvezőbb lehet a PS II és PS I közti energiamegosztás, ami hozzájárulhat a fotoszintetikus rendszer épségének megőrzéséhez.
- ⌘ A fenti folyamatok eredményeképpen SMM-kezelés hatására jelentősen csökken a vírus RNS és köpenyfehérje mennyisége a növényekben.

Az MMS-kezelés hatása MDMV-fertőzés során:

- ⌘ Az MMS-kezelés hatására csökken a virális RNS és a vírus köpenyfehérje mennyisége a növények levelében és gyökerében egyaránt.
- ⌘ Egy és három héttel a kezeléseket után az MMS-előkezelt fertőzött növényekben jelentősen nő a *GF14-6* génexpressziója, míg a második héten csökken. Ez a fluktuáció sejteti, hogy bonyolult szabályozási rendszer áll a génkifejeződés mögött. Hasonló emelkedést eredményez az SMM-kezelés is, viszont MMS-előkezelt fertőzött növényeknél a harmadik héten is magas a gén expressziója, ami sejteti, hogy erősebb és hatékonyabb védelmet fejt ki a vegyület.

- ⌘ MMS-előkezelés hatására fokozódik a *SAMS* génexpressziója, hasonló fluktuációt mutatva, mint a *GF14-6*, viszont az emelkedés nem olyan kifejezett, mint az *smm+mdmv* növényeknél, ami az SA hatásának következménye lehet.
- ⌘ Jelentősen fokozódik a *C4H* és a *CHS* génexpressziója előkezelt fertőzött növényekben, ami az *smm+mdmv* növényeknél is látható volt. Ezáltal fokozódik a fenilpropanoid bioszintézis útvonal aktivitása, melynek eredményeképpen több védő hatású vegyület keletkezik a növényekben.
- ⌘ A fenilpropanoid bioszintézis útvonal aktivitásának fokozódása rövid távon az összfenoloid-tartalom növekedését eredményezi a növények levelében. Érdekesség, hogy ez nem figyelhető meg az SMM-előkezelt fertőzött növényeknél, így ez a változás vélhetően az SA komponensnek köszönhető.
- ⌘ A fenoloidok mellett fokozódik az antioxidáns rendszer aktivitása is. Rövid távon jelentősen nő az *APX*, a *GR* és rövid, illetve hosszabb távon is a *GPX* génexpressziója. A *GPX* izoforma kifejeződése kapcsolatban állhat a *SAMS* és a *GF14-6* szabályozásával.
- ⌘ A kezelés hatására csökken a Δ pH-függő kioltás és fokozódhat a PS II és PS I közti energiamegosztás, mellyel hatékonyabban tudja kioltani a fotokémiai rendszereket ért fölösleges energiát.
- ⌘ A kezelés enyhe fotoinhibíciót okoz és csökkenti az aktív PS II számát is, azonban vírusfertőzött növényeknél az előkezelés során ezek a károsodások nem figyelhetők meg.

Összefoglalás

Kutatásom során arra a kérdésre kerestem a választ, hogy milyen természetes módon lehetne mérsékelni az MDMV-fertőzés hatásait csemegekukorica növényen? Két, természetes alapú vegyülettel, SMM-mel és MMS-sel kezeltem a növényeket, majd ezt követően MDMV-vel fertőztem őket.

Vírusfertőzés során klorotikus mintázat jelenik meg a növények levelein, illetve a vírus a szaporodásához felhasználja a kloroplasztiszok tilakoidmembrán-rendszerét is, ezáltal sérülnek a fotokémiai rendszerek. Az előkezelések hatására csökkent az NPQ értéke, megőrződött a tilakoid membránok integritása és ép maradt a fotokémiai rendszer. Továbbá az előkezelések hatására fertőzött növényekben fokozódott az antioxidáns rendszer aktivitása is, ami révén hatékonyabban tudta a növény a reaktív oxigénformákat semlegesíteni, így csökkentve a fotokémiai rendszer további károsodását.

SMM-mel és MMS-sel előkezelt vírusfertőzött növényeknél fokozódott a fenilpropanoid bioszintézis útvonal aktivitása, nőtt az összfenoloid-tartalom és nőtt azon vegyületek mennyisége, melyek a 440 vagy az 520 nm-es fluoreszcencia tartományban bocsájtanak ki fluoreszcenciát. Az előkezelések hatására fokozódott a *SAMS* génexpressziója is, mely fontos szerepet játszik az SMM-ciklus szabályozásában, ami hozzájárul számos védő hatású vegyület szintéziséhez és anyagcsere-folyamat aktiválásához. Ezáltal elmondható, hogy az SMM és az MMS vírusfertőzés során fokozza az SMM-ciklus aktivitását, és biztosítja védő hatású fenoloidszármazékok mennyiségének a növekedését, az antioxidáns rendszer fokozását, ezáltal a növény védelmét. SMM- és MMS-előkezelt fertőzött növényekben nőtt a *GF14-6* génexpressziója is, ami tipikus válaszreakció MDMV-fertőzés esetén.

A vegyületek nem csak mérséklék a vírusfertőzés során fellépő károsodásokat, hanem csökkentik is a vírus mennyiségét levélben és gyökérben egyaránt. Csökken a vírus RNS mennyisége a növényekben, melynek eredményeképpen visszaszorul a szaporodása. Ezáltal sérül a virális köpenyfehérje szintézise is, így csökken a köpenyfehérje mennyisége is a növényekben.

Az eredmények alapján látható, hogy az SMM és az MMS számos ponton szabályozza a növényi anyagcserét, és ezek a változások jótékonyan hatnak a növény védekezőrendszerére, melynek köszönhetően hatékonyabb védekezés valósul meg. Kutatásom során ezáltal sikeresen igazoltam az SMM és az MMS jótékony hatását MDMV-fertőzés során csemegekukoricában.

Summary

During the investigation my aim was to find a natural way by which the harmful effects of MDMV infection can be moderated in sweet corn. The plants were treated with two compounds of natural origin (SMM and MMS), and afterwards they were infected with MDMV.

In the course of MDMV infection chlorotic patterns appear on the leaves, and the virus uses the thylakoid membranes of the chloroplasts for its replication. As a consequence, the photochemical systems get damaged. With the application of SMM or MMS, the value of the NPQ decreases, and the thylakoid membranes remain intact and work properly. Moreover, in infected plants SMM and MMS trigger the activity of the antioxidant system, therefore the plants can more effectively scavenge the reactive oxygen species, which further reduces the damage exerted by the infection on the photochemical systems.

In plants, that were pre-treated with SMM or MMS prior to infection, the activity of the phenylpropanoid pathway was enhanced. The total phenolic content and the amount of those molecules that emit fluorescence at 440 and 520 nm also increased. As a result of the pre-treatments, the gene expression of *SAMS* increased, which plays a crucial role in the regulation of the SMM-cycle. The SMM-cycle contributes to the synthesis of certain defence compounds, such as phenoloids, therefore the enhancement of the SMM-cycle also has an impact on the amount of these compounds. Moreover, it contributes to an increase in the activity of the antioxidant system. Therefore, it can be concluded, that in the case of viral infection, SMM and MMS increase the activity of the SMM-cycle, consequently they contribute to an increase in the amount of certain defence compounds. Pre-treatment with SMM or MMS also increased the gene expression of *GF14-6*, which is considered to be a typical response during MDMV-infection.

It is important to note, that SMM and MMS not only ameliorate the plants' defence response against viral infection, but the treatments also result in a decrease in the amount of viral RNA and the viral coat protein, in roots and leaves, as well.

According to the results it can be stated, that SMM and MMS have great impact on the plant metabolism, and they contribute to a better plant defence against viral infection in sweet corn plants.

Irodalomjegyzék

- Achon MA, Larrañaga A, Alonso-Dueñas N: The population genetics of maize dwarf mosaic virus in Spain. *Archives of Virology* 157: 2377-2382, 2012.
- Almási A, Apatini D, Bóka K, Böddi B, Gáborjányi R: BSMV infection inhibits chlorophyll biosynthesis in barley plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56: 227-233, 2000.
- Asada K: Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* 85: 235-241, 1992.
- Atkinson NJ, Urwin PE: The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany* 63: 3523-3544, 2012.
- Baker NR: Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology* 59: 89-113, 2008.
- Baker NR, Rosenqvist E: Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany* 55: 1607-1621, 2004.
- Balachandran S, Osmond CB, Daley PF: Diagnosis of the earliest strain-specific interactions between Tobacco mosaic virus and chloroplasts of tobacco leaves in vivo by means of chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology* 104: 1059-1065, 1994.
- Beddard GS, Porter G: Concentration quenching in chlorophyll. *Nature* 260: 366-367, 1976.
- Bellés JM, López-Gresa MP, Fayos J, Pallás V, Rodrigo I, Conejero V: Induction of cinnamate 4-hydroxylase and phenylpropanoids in virus-infected cucumber and melon plants. *Plant Science* 174: 524-533, 2008.
- de Boer AH, van Kleeff PJM, Gao J: Plant 14-3-3 proteins as spiders in a web of phosphorylation. *Protoplasma* 250: 425-440, 2013.
- Bourgis F, Roje S, Nuccio ML, Fisher DB, Tarczynski MC, Li C, Herschbach C, Rennenberg H, Pimenta MJ, Shen TL, Gage DA, Hanson AD: S-methylmethionine plays a major role in phloem sulfur transport and is synthesized by a novel type of methyltransferase. *The Plant Cell* 11: 1485-1497, 1999.
- Buschmann C: Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves. *Photosynthesis Research* 92: 261-271, 2007.

- Buschmann C, Langsdorf G, Lichtenthaler HK: Imaging of the blue, green, and red fluorescence emission of plants: an overview. *Photosynthetica* 38: 483-491, 2000.
- Buschmann C, Lichtenthaler HK: Principles and characteristics of multi-colour fluorescence imaging in plants. *Journal of Plant Physiology* 152: 297-314, 1998.
- Bürling K, Hunsche M, Noga G: Use of blue-green and chlorophyll fluorescence measurements for differentiation between nitrogen deficiency and pathogen infection in winter wheat. *Journal of Plant Physiology* 168: 1641-1648, 2011.
- Campo ÂD, Ferreira AG, Hampe MMV, Antunes IF, Brancão N, Silveira EP, da Silva JB, Osório VA: Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by salicylic acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 15: doi: 10.1590/S1677-04202003000300001, 2003.
- Campo S, Peris-Peris C, Montesinos L, Peñas G, Messeguer J, Segundo BS: Expression of the maize ZmGF₁₄₋₆ gene in rice confers tolerance to drought stress while enhancing susceptibility to pathogen infection. *Journal of Experimental Botany* 63: 983-999, 2012.
- Cassone BJ, Chen Z, Chiera J, Stewart LR, Redinbaugh MG: Responses of highly resistant and susceptible maize to vascular puncture inoculation with *Maize dwarf mosaic virus*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 86: 19-27, 2014.
- Chaerle L, Pineda M, Romero-Aranda R, van der Straeten D, Barón M: Robotized thermal and chlorophyll fluorescence imaging of pepper mild mottle virus infection in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell Physiology* 47: 1323-1336, 2006.
- Chaerle L, van der Straeten D: Imaging techniques and the early detection of plant stress. *Trends in Plant Science* 5: 495-501, 2000.
- Chappelle EW, Wood FM, McMurtrey JE, Newcourt WW: Laser-induced fluorescence of green plants. 3: LIF spectral signatures of five major plant types. *Applied Optics* 24: 74-80, 1985.
- Chen F, Li Q, Sun L, He Z: The rice 14-3-3 gene family and its involvement in responses to biotic and abiotic stress. *DNA Research* 13: 53-63, 2006.
- Chen S, Das P, Hari V: In situ localization of ATPase activity in cells of plants infected by maize dwarf mosaic potyvirus. *Archives of Virology* 134: 433-439, 1994.
- Choi CW: Modified plasmodesmata in *Sorghum* (*Sorghum bicolor* L. Moench) leaf tissues infected by maize dwarf mosaic virus. *Journal of Plant Biology* 42: 63-70, 1999.

- Clark MF, Adams AN: Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-483, 1977.
- Clarke SF, Guy PL, Burritt DJ, Jameson PE: Changes in the activities of antioxidant enzymes in response to virus infection and hormone treatment. *Physiologia Plantarum* 114: 157-164, 2002.
- Cohen AS, Popovic RB, Zalik S: Effects of polyamines on chlorophyll and protein content, photochemical activity, and chloroplast ultrastructure of barley leaf discs during senescence. *Plant Physiology* 64: 717-720, 1979.
- Denison FC, Paul AL, Zupansk AK, Ferl RJ: 14-3-3 proteins in plant physiology. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22: 720-727, 2011.
- Dixon RA, Paiva NL: Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* 7: 1085-1097, 1995.
- Durner J, Klessig DF: Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 11312-11316, 1995.
- Edwards ML, Cooper JI: Plant virus detection using a new form of indirect ELISA. *Journal of Virological Methods* 11: 309-319, 1985.
- Eun AJC, Wong SM: Molecular beacons: a new approach to plant virus detection. *Phytopathology* 90: 269-275, 2000.
- Fodor J, Gullner G, Adam AL, Barna B, Komives T, Király Z: Local and systemic responses of antioxidants to Tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in tobacco (role in systemic acquired resistance). *Plant Physiology* 114: 1443-1451, 1997.
- Foyer CH, Halliwell B: The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21-25, 1976.
- Friedt W: Mechanical transmission of soil-borne Barley yellow mosaic virus. *Phytopathologische Zeitschrift* 106: 16-22, 1983.
- Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Shinozaki KY, Shinozaki K: Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 436-442, 2006.
- Gell Gy, Balázs E, Petrik K: Genetic diversity of Hungarian *Maize dwarf mosaic virus* isolates. *Virus Genes* 40: 277-281, 2010.

- Gell Gy, Petrik K, Balázs E: A unique nucleotide sequence variant in the coat protein region of the genome of a Maize dwarf mosaic virus isolate. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 46: 11-15, 2011.
- Ghasemzadeh A, Jaafar HZE, Karimi E: Involvement of salicylic acid on antioxidant and anticancer properties, anthocyanin production and chalcone synthase activity in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) varieties. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 14828-14844, 2012.
- Gilmore AM, Yamamoto HY: Zeaxanthin formation and energy-dependent fluorescence quenching in pea chloroplasts under artificially mediated linear and cyclic electron transport. *Plant Physiology* 96: 635-643, 1991.
- Giovanelli J, Mudd SH, Datko AH: Sulfur amino acids in plants. In: Mifflin BJ (ed) *The Biochemistry of Plants*. Vol. 5, London, New-York Academic Press pp. 453-505, 1980.
- Gondor OK, Janda T, Soós V, Pál M, Majláth I, Adak MK, Balázs E, Szalai G: Salicylic acid induction of flavonoid biosynthesis pathways in wheat varies by treatment. *Frontiers in Plant Science* 7: 1447, 2016a.
- Gondor OK, Pál M, Darkó É, Janda T, Szalai G: Salicylic acid and sodium salicylate alleviate cadmium toxicity to different extents in maize (*Zea mays* L.). *Public Library of Science* 11(8): e0160157, 2016b.
- Guo DP, Guo YP, Zhao JP, Liu H, Peng Y, Wang QM, Chen JS, Rao GZ: Photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in leaves of stem mustard (*Brassica juncea* var. tsatsai) after turnip mosaic virus infection. *Plant Science* 168: 57-63, 2005.
- Hammond J: Serological relationships between the cylindrical inclusion proteins of Potyviruses. *Phytopathology* 88: 965-971, 1998.
- Hataya T, Inoue AK, Shikata E: A PCR-microplate hybridization method for plant virus detection. *Journal of Virological Methods* 46: 223-236, 1994.
- Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad A: Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany* 68: 14-25, 2010.
- Hendrickson L, Förster B, Pogson BJ, Chow WS: A simple chlorophyll fluorescence parameter that correlates with the rate coefficient of photoinactivation of photosystem II. *Photosynthesis Research* 84: 43-49, 2005.

- Hideg É, Juhász M, Bornman JF, Asada K: The distribution and possible origin of blue-green fluorescence in control and stressed barley leaves. *Photochemical & Photobiological Science* 1: 934-941, 2002.
- Hoagland DR, Arnon DI: The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station* 347. ed., Berkeley, California, 1938.
- Hodgson RAJ, Beachy RN, Pakrasi HB: Selective inhibition of photosystem II in spinach by tobacco mosaic virus: An effect of the viral coat protein. *FEBS* 245: 267-270, 1989.
- Horton P, Ruban A: Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. *Journal of Experimental Botany* 56: 365-373, 2005.
- Hura T, Grzesiek S, Hura K, Thiemt E, Tokarz K, Wedzony M: Physiological and biochemical tools useful in drought-tolerance detection in genotypes of winter triticale: accumulation of ferulic acid correlates with drought tolerance. *Annals of Botany* 100: 767-775, 2007.
- Jahns P, Latowski D, Strzalka K: Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: The role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787: 3-14, 2009.
- Janda K, Hideg É, Szalai G, Kovács L, Janda T: Salicylic acid may indirectly influence the photosynthetic electron transport. *Journal of Plant Physiology* 169: 971-978, 2012.
- Janda T, Gondor OK, Yordanova R, Szalai G, Pál M: Salicylic acid and photosynthesis: signalling and effects. *Acta Physiologiae Plantarum* 36: 2537-2546, 2014.
- Kang HM, Saltveit ME: Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling leaves and roots are differentially affected by salicylic acid. *Physiologia Plantarum*, 115: 571-576, 2002.
- Karpinski S, Gabrys H, Mateo A, Karpinska B, Mullineaux PM: Light perception in plant disease defence signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 390-396, 2003.
- Kereïche S, Kiss AZ, Kouřil R, Boekema EJ, Horton P: The PsbS protein controls the macro-organisation of photosystem II complexes in the grana membranes of higher plant chloroplasts. *FEBS Letters* 854: 759-764, 2010.
- Khan MK, Huma ZE, Dangles O: A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis* 33: 85-104, 2014.
- Khodary SEA: Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt stressed maize plants. *International Journal of Agriculture & Biology* 6: 5-8, 2004.

- Ko SH, Eliot AC, Kirsch JF: S-methylmethionine is both a substrate and an inactivator of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 421: 85-90, 2004.
- Kocsis MG, Ranocha P, Gage DA, Simon ES, Rhodes D, Peel GJ, Mellema S, Saito K, Awazuhara M, Li C, Meeley RB, Rarczynski MC, Wagner C, Hanson AD: Insertional inactivation of the methionine S-methyltransferase gene eliminates the S-methylmethionine cycle and increases the methylation ratio. *Plant Physiology* 131: 1808-1815, 2003.
- Kofalvi SA, Nassuth A: Influence of *Wheat streak mosaic virus* infection on phenylpropanoid metabolism and the accumulation of phenolics and lignin in wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 47: 365-377, 1995.
- Konagaya KI, Matsushita Y, Kasahara M, Nyunoya H: Members of 14-3-3 protein isoforms interacting with the resistance gene product N and the elicitor of *Tobacco mosaic virus*. *Journal of General Plant Pathology* 70: 221-231, 2004.
- Kong P, Steinbiss HH: Complete nucleotide sequence and analysis of the putative polyprotein of maize dwarf mosaic virus genomic RNA. *Archives of Virology* 143: 1791-1799, 1998.
- Kósa E, Szegő D, Horváth E: Relationship between S-methylmethionine treatment and the activities of antioxidant enzymes in maize (*Zea mays* L.) leaves at chilling temperatures. *Acta Agronomica Hungarica* 57: 461-469, 2009.
- Kósa E, Szegő D, Horváth E, Rácz I, Szigeti Z, Lásztity D, Páldi E: Effect of S-methylmethionine on the photosynthesis in maize at different chilling temperatures. *Central European Journal of Biology* 6: 75-83, 2011.
- Lang M, Stober F, Lichtenthaler HK: Fluorescence emission spectra of plant leaves and plant constituents. *Radiation and Environmental Biophysics* 30: 333-347, 1991.
- Laws B: *Fifty plants that changed the course of history*. Firefly books Ltd. ISBN 978-963-09-6664-1, 2010.
- Lee GP, Min BE, Kim CS, Choi SH, Harn CH, Kim SU, Ryu KH: Plant virus cDNA chip hybridization for detection and differentiation of four cucurbit-infecting Tobamoviruses. *Journal of Virological Methods* 110: 19-24, 2003.
- Legrand M, Fritig B, Hirth L: Enzymes of the phenylpropanoid pathway and the necrotic reaction of hypersensitive tobacco to tobacco mosaic virus. *Phytochemistry* 15: 1353-1359, 1976.

- Lewsey M, Palukaitis P, Carr PJ: Plant-virus interactions: defence and counter-defence. Chapter 6. *Annual Plant Reviews* 34: 134-176, 2009.
- Li L, Wang X, Zhou G: Analyses of maize embryo invasion by sugarcane mosaic virus. *Plant Science* 172: 131-138, 2007.
- Li Z, Burritt DJ: The influence of *Cocksfoot mottle virus* on antioxidant metabolism in the leaves of *Dactylis glomerata* L. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62: 285-295, 2003.
- Lichtenthaler HK, Buschmann C, Knapp M: How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio R_{FD} of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica* 43: 379-393, 2005.
- Lichtenthaler HK, Hak R, Rinderle U: The chlorophyll fluorescence ratio F_{690}/F_{730} in leaves of different chlorophyll content. *Photosynthesis Research* 25: 295-298, 1990.
- Lichtenthaler HK, Schweiger J: Cell wall bound ferulic acid, the major substance of the blue-green fluorescence emission of plants. *Journal of Plant Physiology* 152: 272-282, 1998.
- Lozano-Durán R, Robatzek S: 14-3-3 proteins in plant-pathogen interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28: 511-518, 2015.
- Ludmerszki E, Almási A, Rácz I, Szigeti Z, Solti Á, Oláh C, Rudnóy S: S-methylmethionine contributes to enhanced defense against *Maize dwarf mosaic virus* infection in maize. *Brazilian Journal of Botany* 38: 771-782, 2015.
- Ludmerszki E, Chounramany S, Oláh C, Kátay G, Rácz I, Almási A, Solti Á, Bélai I, Rudnóy S: Protective role of S-methylmethionine-salicylate in maize plants infected with *Maize dwarf mosaic virus*. *European Journal of Plant Pathology* in press DOI: 10.1007/s10658-017-1174-0, 2017.
- Ludmerszki E, Páldi K, Rácz I, Szigeti Z, Rudnóy S: The promising role of exogenous S-methylmethionine in agriculture, in the case of maize cultivation. *Applied Ecology and Environmental Research* 12: 777-785, 2014c.
- Ludmerszki E, Rácz I, Rudnóy S: S-methylmethionine alters gene expression of candidate genes in Maize dwarf mosaic virus infected and drought stressed maize plants. *Acta Biologica Szegediensis* 58: 1-5, 2014a.
- Ludmerszki E, Rácz I, Rudnóy S: The protective role of SMM against dwarf mosaic virus infection in maize. *Georgikon for Agriculture, a Multidisciplinary Journal in Agricultural Sciences* 19: 68-72, 2014b.

- Ludmerszki E, Rudnóy S, Almási A, Szigeti Z, Rácz I: The beneficial effects of S-methyl-methionine in maize in the case of *Maize dwarf mosaic virus* infection. *Acta Biologica Szegediensis* 55: 109-112, 2011.
- Madamanchi NR, Alscher RG: Metabolic bases for differences in sensitivity of two pea cultivars to sulfur dioxide. *Plant Physiology* 97: 88-93, 1991.
- Marathe R, Anandalakshmi R, Smith TH, Pruss GJ, Vance VB: RNA viruses as inducers, suppressors and targets of post-transcriptional gene silencing. *Plant Molecular Biology* 43: 295-306, 2000.
- Mateo A, Funck D, Mühlenbock P, Kular B, Mullineaux PM, Karpinski S: Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis. *Journal of Experimental Botany* 57: 1795-1807, 2006.
- Maule AJ, Ride JP: Cinnamate 4-hydroxylase and hydroxycinnamate:CoA ligase in wheat leaves infected with *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 22: 1113-1116, 1983.
- Mayhew DE, Ford RE: Detection of ribonuclease-resistant RNA in chloroplasts of corn leaf tissue infected with *Maize dwarf mosaic virus*. *Virology* 57: 503-509, 1974.
- McRorie RA, Sutherland GL, Lewis MS, Barton AD, Glazener MR, Shive W: Isolation and identification of a naturally occurring analog of methionine. *Journal of American Chemical Society* 76: 115-118, 1954.
- Meyer S, Cartelat A, Moya I, Cerovic ZG: UV-induced blue-green and far-red fluorescence along wheat leaves: a potential signature of leaf ageing. *Journal of Experimental Botany* 54: 757-769, 2003.
- Mittler R: Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410, 2002.
- Mittler R: ROS are good. *Trends in Plant Science* 22: 11-19, 2017.
- Mittler R, Feng X, Cohen M: Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Plant Cell* 10: 461-473, 1998.
- Miura K, Tada Y: Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Frontiers in Plant Science* 5: 4 (pp. 1-12.), 2014.

- Moharekar ST, Lokhande SD, Hara T, Tanaka R, Tanaka A, Chavan PD: Effect of salicylic acid on chlorophyll and carotenoid contents of wheat and moong seedlings. *Photosynthetica* 41: 315-317, 2003.
- Monago-Maraña O, Durán-Merás I, Galeano-Díaz T, de la Peña AM: Fluorescence properties of flavonoid compounds. Quantification in paprika samples using spectrofluorimetry coupled to second order chemometric tools. *Food Chemistry* 196: 1058-1065, 2016.
- Montero R, Pérez-Bueno ML, Barón M, Florez-Sarasa I, Tohge T, Fernie AR, El aou ouad H, Flexas J, Bota J: Alterations in primary and secondary metabolism in *Vitis vinifera* ‘Malvasía de Banyalbufar’ upon infection with Grapevine leafroll-associated virus 3. *Physiologia Plantarum* 157: 442-452, 2016.
- Morales F, Cerovic ZG, Moya I: Time-resolved blue-green fluorescence of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. Spectroscopic evidence for the presence of ferulic acid as the main fluorophore of the epidermis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1273: 251-262, 1996.
- Mudd SH, Datko AH: The S-methylmethionine cycle in *Lemna paucicostata*. *Plant Physiology* 93: 623-630, 1990.
- Murata N, Allakhverdiev SI, Nishiyama Y: The mechanism of photoinhibition *in vivo*: Re-evaluation of the roles of catalase, α -tocopherol, non-photochemical quenching, and electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 1817: 1127-1133, 2012.
- Musetti R, Bruni L, Favali MA: Cytological modifications in maize plants infected by barley yellow dwarf mosaic virus and maize dwarf mosaic virus. *Micron* 33: 681-686, 2002.
- Naidu RA, Krishnan M, Nayudu MV, Gnanam A: Studies on peanut green mosaic virus infected peanut (*Arachis hypogaea* L.) leaves. II. Chlorophyll-protein complexes and polypeptide composition of thylakoid membranes. *Physiological Plant Pathology* 25: 191-198, 1984.
- Nakahara KS, Masuta C, Yamada S, Shimura H, Kashiwara Y, Wada TS, Meguro A, Goto K, Tadamura K, Sueda K, Sekiguchi T, Shao J, Ichoda N, Matsumura T, Igarashi M, Ito K, Carthew RW, Uyeda I: Tobacco calmodulin-like protein provides secondary defense by binding to an directing degradation of virus RNA silencing suppressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 10113-10118, 2012.
- Nakano Y, Asada K: Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant & Cell Physiology* 22: 867-880, 1981.

- Nazarli H, Zardashti MR, Darvishzadeh R, Mohammadi M: Change in activity of antioxidative enzymes in young leaves of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by application of super absorbent synthetic polymers under drought stress condition. *Australian Journal of Crop Science* 5: 1334-1338, 2011.
- Niyogi KK: Safety valves for photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 455-460, 2000.
- Oertel U, Schubert J, Fuchs E: Sequence comparison of the 3'-terminal parts of the RNA of four German isolates of sugarcane mosaic potyvirus (SCMV). *Archives of Virology* 142: 675-687, 1997.
- Osmond CB, Daley PF, Badger MR, Lüttge U: Chlorophyll fluorescence quenching during photosynthetic induction in leaves of *Abutilon striatum* Dicks. infected with Abutilon mosaic virus, observed with a field-portable imaging system. *Botanica Acta* 111: 390-397, 1998.
- Pascal AA, Liu Z, Broess K, van Oort B, van Amerongen H, Wang C, Horton P, Robert B, Chang W, Ruban A: Molecular basis of photoprotection and control of photosynthetic light-harvesting. *Nature Letters* 436: 134-137, 2005.
- Páldi K, Rácz I, Szigeti Z, Rudnóy S: S-methylmethionine alleviates the cold stress by protection of the photosynthetic apparatus and stimulation of the phenylpropanoid pathway. *Biologia Plantarum* 58: 189-194, 2014.
- Peleman J, Boerjan W, Engler G, Seurinck J, Botterman J, Alliotte T, Montagu MV, Inzé D: Strong cellular preference in the expression of a housekeeping gene of *Arabidopsis thaliana* encoding S-adenosylmethionine synthetase. *The Plant Cell* 1: 81-93, 1989a.
- Peleman J, Saito K, Cottyn B, Engler G, Seurinck J, Montagu MV, Inzé D: Structure and expression analysis of the S-adenosylmethionine synthetase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 84: 359-369, 1989b.
- Petrik K, Sebestyén E, Gell Gy, Balázs E: Natural insertions within the N-terminal region of the coat protein of Maize dwarf mosaic potyvirus (MDMV) have an effect on the RNA stability. *Virus Genes* 40: 135-139, 2010.
- Pérez-Bueno ML, Ciscato M, van de Ven M, García-Luque I, Valcke R, Barón M: Imaging viral infection: studies on *Nicotiana benthamiana* plants infected with the pepper mild mottle tobamovirus. *Photosynthesis Research* 90: 111-123, 2006.
- Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29 (9): e45, 2001.

- Piñeda M, Gáspár L, Morales F, Szigeti Z, Barón M: Multicolor fluorescence imaging of leaves - a useful tool for visualizing systemic viral infections in plants. *Photochemistry and Photobiology* 84: 1048-1060, 2008.
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE: Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 975: 384-394, 1989.
- Pradeep K, Satya VK, Selvapriya M, Vijayasamundeeswari A, Ladhakshmi D, Paranidharan V, Rabindran R, Samiyappan R, Balasubramanian P: Engineering resistance against Tobacco streak virus (TSV) in sunflower and tobacco using RNA interference. *Biologia Plantarum* 56: 735-741, 2012.
- Radwan DEM, Fayez KA, Mahmoud SY, Hamad A, Lu G: Physiological and metabolic changes of *Cucurbita pepo* leaves in response to zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) infection and salicylic acid treatment. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 480-489, 2007.
- Rahoutei J, García-Luque I, Barón M: Inhibition of photosynthesis by viral infection: Effect on PSII structure and function. *Physiologia Plantarum* 110: 286-292, 2000.
- Ranocha P, McNeil SD, Ziemak MJ, Li C, Tarczynski MC, Hanson AD: The S-methylmethionine cycle in angiosperms: ubiquity, antiquity and activity. *Plant Journal* 25: 575-584, 2001.
- Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP, Murr DP, Watkins CB: Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes (salicylic acid mediated oxidative damage requires H₂O₂). *Plant Physiology* 115: 137-149, 1997.
- Raskin I: Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 439-463, 1992.
- Rácz I, Páldi E, Szalai G, Janda T, Pál M, Lásztity D: S-methylmethionine reduces cell membrane damage in higher plants exposed to low-temperature stress. *Journal of Plant Physiology* 165: 1483-1490, 2008.
- Reneiro A, Beachy RN: Association of TMV coat protein with chloroplast membranes in virus-infected leaves. *Plant Molecular Biology* 6: 291-301, 1986.
- Riedle-Bauer M: Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in systemic virus infections of plants. *Journal of Phytopathology* 148: 297-302, 2000.

- Roberts PL, Wood KR: Effects of a severe (P6) and a mild (W) strain of cucumber mosaic virus on tobacco leaf chlorophyll, starch and cell ultrastructure. *Physiological Plant Pathology* 21: 31-37, 1982.
- Ruban AV, Horton P: Regulation of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in plants. *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 221-230, 1995.
- Rudnóy S, Majláth I, Pál M, Páldi K, Rácz I, Janda T: Interactions of S-methylmethionine and UV-B can modify the defence mechanisms induced in maize. *Acta Physiologiae Plantarum* 37: 148, 2015.
- Ruiz-Ferrer V, Voinnet O: Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annual Review of Plant Biology* 60: 485-510, 2009.
- Salomon R, Bernardi F: Inhibition of viral aphid transmission by the N-terminus of the maize dwarf mosaic virus coat protein. *Virology* 213: 676-679, 1995.
- Salzman RA, Brady JA, Finlayson SA, Buchanan CD, Summer EJ, Sun F, Klein PE, Klein RR, Pratt LH, Cordonnier-Pratt MM, Mullet JE: Transcriptional profiling of sorghum induced by methyl jasmonate, salicylic acid, and aminocyclopropane carboxylic acid reveals cooperative regulation and novel gene responses. *Plant Physiology* 138: 352-368, 2005.
- Sato CS, Byerrum RU, Albersheim P, Bonner J: Metabolism of methionine and pectin esterification in a plant tissue. *Journal of Biological Chemistry* 233: 128-131, 1958.
- Shi Q, Bao Z, Zhu Z, Ying Q, Qian Q: Effects of different treatments of salicylic acid on heat tolerance, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzyme activity in seedlings of *Cucumis sativa* L. *Plant Growth Regulation* 48: 127-135, 2006.
- Shiboleth YM, Haronsky E, Leibman D, Arazi T, Wassenegger M, Whitham SA, Gaba V, Gal-On A: The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development. *Journal of Virology* 81: 13135-13148, 2007.
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K: Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* 53: 1305-1319, 2002.
- Simaei M, Khavarinejad RA, Saadatmand S, Bernard F, Fahimi H: Interactive effects of salicylic acid and nitric oxide on soybean plants under NaCl salinity. *Russian Journal of Plant Physiology* 58: 783, 2011.

- Singh DP, Moore CA, Gilliland A, Carr JP: Activation of multiple antiviral defence mechanisms by salicylic acid. *Molecular Plant Pathology* 5: 57-63, 2004.
- Solti Á, Lenk S, Mihailova G, Mayer P, Barócsi A, Georgieva K: Effects of habitat light conditions on the excitation quenching pathways in desiccating *Haberlea rhodopensis* leaves: an Intelligent FluoroSensor study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 130: 217-225, 2014.
- Stewart LR, Bouchard R, Redinbaugh MG, Meulia T: Complete sequence and development of a full-length infectious clone of an Ohio isolate of Maize dwarf mosaic virus (MDMV). *Virus Research* 165: 219-224, 2012.
- Szalai G, Pál M, Horváth E, Janda T, Páldi E: Investigations on the adaptability of maize lines and hybrids to low temperature and cadmium. *Acta Agronomica Hungarica* 53: 183-196, 2005.
- Szegő D, Lőrincz I, Soós V, Páldi E, Visnovitz T, Bratek Z, Lásztity D, Szigeti Z, Rácz I: Protective effect of the naturally occurring, biologically active compound S-methylmethionine in maize seedlings exposed to a short period of cold. *Cereal Research Communications* 37: 419-429, 2009.
- Szigeti Z: Physiological status of cultivated plants characterised by multi-wavelength fluorescence imaging. *Acta Agronomica Hungarica* 56: 223-234, 2008.
- Tadamura K, Nakahara KS, Masuta C, Uyeda I: Wound-induced rgs-CaM gets ready for counterresponse to an early stage of viral infection. *Plant Signaling & Behavior* 7: 1548-1551, 2012.
- Teklemariam TA, Blake TJ: Phenylalanine ammonia-lyase-induced freezing tolerance in jack pine (*Pinus banksiana*) seedlings treated with low, ambient levels of ultraviolet-B radiation. *Physiologia Plantarum* 122: 244-253, 2004.
- Tian M, Sasvari Z, Gonzalez PA, Friso G, Rowland E, Liu XM, Wijk KJ, Nagy PD, Klessig DF: Salicylic acid inhibits the replication of *Tomato bushy stunt virus* by directly targeting a host component in the replication complex. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28: 379-386, 2015.
- Tóbiás I, Bakadjieva N, Palkovics L: Bolgár és magyar kukorica csíkos mozaik vírus-izolátumok összehasonlítása. *Növényvédelem* 44: 385-389, 2008.
- Torres MA: ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum* 138: 414-429, 2010.

- Treutter D: Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters* 4: 147-157, 2006.
- Urcuqui-Inchima S, Haenni AL, Bernardi F: Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research* 74: 157-175, 2001.
- Uzarowska A, Dionisio G, Sarholz B, Piepho HP, Xu M, Ingvaridsen CR, Wenzel G, Lübberstedt T: Validation of candidate genes putatively associated with resistance to SCMV and MDMV in maize (*Zea mays* L.) by expression profiling. *BMC Plant Biology* 9: 15, 2009.
- de Vetten NC, Ferl RJ: Two genes encoding GF14 (14-3-3) proteins in *Zea mays* – Structure, expression, and potential regulation by the G-box-binding complex. *Plant Physiology* 106: 1593-1604, 1994.
- Vicente MRS, Plasencia J: Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany* 62: 3321-3338, 2011.
- Wadsworth S, Dunoyer P: Plant RNA-silencing immunity and viral counter-defence strategies. In Bouarab K, Brisson N, Daayf F eds., *Molecular Plant-Microbe Interactions*. CABI, London, pp. 1-35, 2009.
- Wei T, Huang TS, McNeil JF, Laliberté JF, Hong J, Nelson RS, Wang A: Sequential recruitment of the endoplasmic reticulum and chloroplasts for plant potyvirus replication. *Journal of Virology* 84: 799–809, 2010.
- Williams MM, Pataky JK: Interactions between maize dwarf mosaic and weed interference on sweet corn. *Field Crops Research* 128: 48-54, 2012.
- Yamori W, Shikanai T: Physiological functions of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis and plant growth. *Annual Review of Plant Biology* 67: 81-106, 2016.
- Zaitlin M, Jagendorf AT: Photosynthetic phosphorylation and Hill reaction activities of chloroplasts isolated from plants infected with Tobacco mosaic virus. *Virology* 12: 477-486, 1960.
- Zhang C, Song Y, Jiang F, Li G, Jiang Y, Zhu C, Wen F: Virus resistance obtained in transgenic tobacco and rice by RNA interference using promoters with distinct activity. *Biologia Plantarum* 56: 742-748, 2012.
- Zhang ZY, Yang L, Zhou SF, Wang HG, Li WC, Fu FL: Improvement of resistance to maize dwarf mosaic virus mediated by transgenic RNA interference. *Journal of Biotechnology* 153: 181-187, 2011.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani dr. Fodor Ferencnek, a Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék vezetőjének, hogy lehetővé tette számomra a munkát az általa vezetett tanszéken.

Köszönettel tartozom dr. Rácz Ilonának, dr. Solti Ádámnak, dr. Almási Asztériának, dr. Lásztity Demeternek és Oláh Csillának szakmai támogatásukért és együttműködésükért.

Köszönöm a technikai segítséget Balogh Györgyinek.

Végül, de nem utolsósorban hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, dr. Rudnóy Szabolcsnak türelmes, támogató és inspiráló vezetéséért.

A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/1-11-1-2012-0001 azonosító számú projekt és az OTKA/NFK1 K 108834 pályázat támogatásával valósult meg.

DOI adatlap a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához*

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: Ludmerszki Edit

MTMT-azonosító: 10040170

A doktori értekezés címe és alcíme: Az S-metilmethionin és az S-metilmethionin-szalicilát hatása kukorica csíkos mozaik vírus fertőzése esetén

DOI-azonosító⁴⁶: 10.15476/ELTE.2017.039.

A doktori iskola neve: Biológia Doktori Iskola

A doktori iskolán belüli doktori program neve: Kísérletes Növénybiológia Program

A témavezető neve és tudományos fokozata: dr. Rudnóy Szabolcs, adjunktus

A témavezető munkahelye: Eötvös Loránd Tudományegyetem, Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék

II. Nyilatkozatok

1. A doktori értekezés szerzőjeként

a) hozzájárulok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi kar Dékáni Hivatali Doktori, Habilitációs és Nemzetközi Ügyek Csoportjának ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (*dátum*)-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.

2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

- a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudomásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;
- b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: Budapest, 2017. 04. 22.



.....
a doktori értekezés szerzőjének aláírása

**ELTE SZMSZ SZMR 12. sz. melléklet*